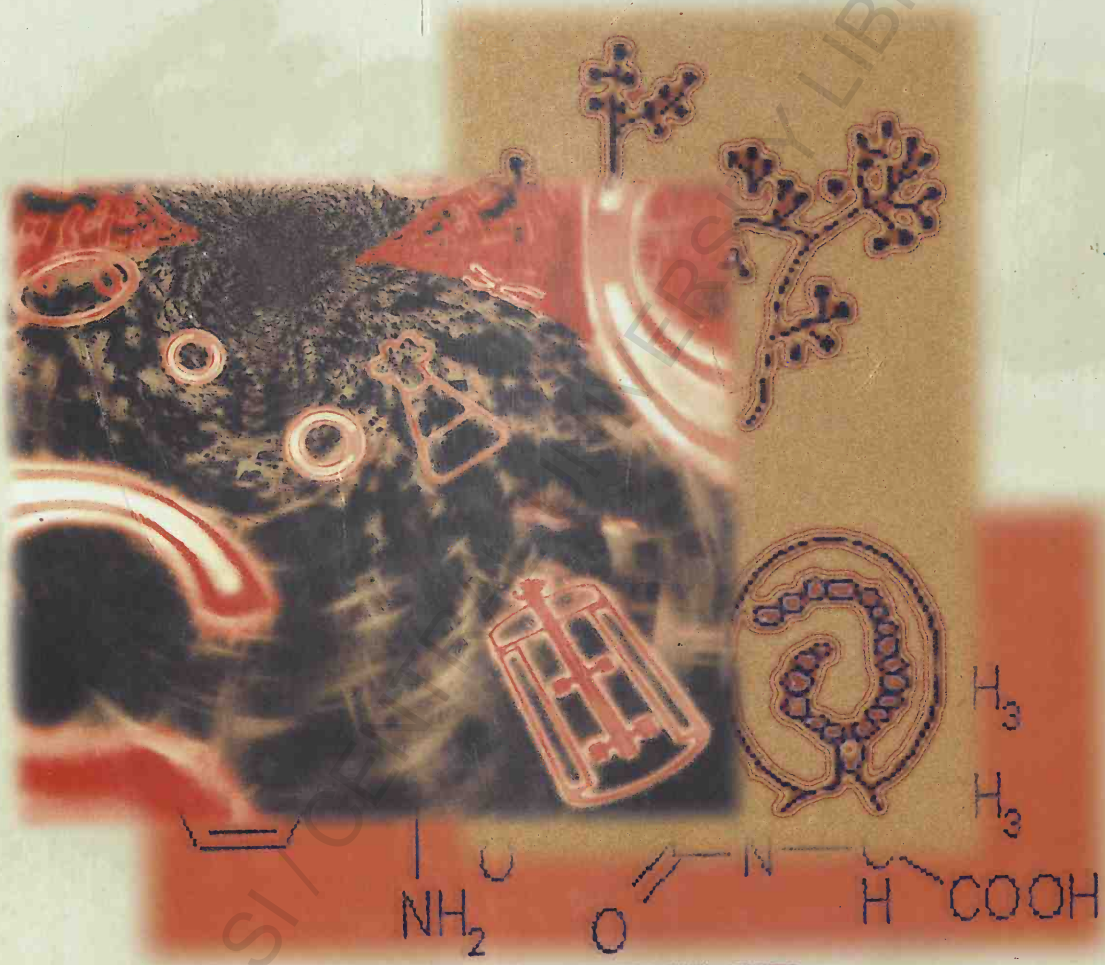
Ștefana JURCOANE

Elena SĂSĂRMAN
Ana ROȘU
Alexandra BANU

Irina LUPESCU
Radiana BEREHOIU TAMBA
Florentina RĂDOI

Universitaria



TRATAT DE BIOTEHNOLOGIE

VOL. I

EDITURA TEHNICĂ

CU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ștefana JURCOANE

Elena SĂSĂRMAN
Ana ROȘU
Alexandra BANU
Irina LUPESCU
Radiana BEREHOIU TAMBA
Florentina RĂDOI

Colecția UNIVERSITARIA

TRATAT DE BIOTEHNOLOGIE

Vol. I

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dedicăm această carte
familiilor noastre și colegilor
pentru încurajare, răbdare și înțelegere

Autorii

Biotechnology

Recent developments in genetics and molecular biology have excited a world-wide interest in biotechnology.

Scientific breakthroughs in gene expression and protein engineering are being translated by a strengthening biotechnology industry into revolutionary new products and services.

The primary aim of this book is to present the principles of bioprocesses, in a way that is accessible to scientist.

The chapters are organized around the main subdisciplines: Fundamnetal biotechnology, Bioreactors, Enzimes biotechnology antibiotics and Plant biotechnology. The variety of bioprocess industries is illustrated by typical examples. Also, the book contains aspects concerning the applications of genetics in biotechnology.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ștefana JURCOANE

Elena SĂSĂRMAN
Ana ROȘU
Alexandra BANU
Irina LUPESCU
Radiana BEREHOIU TAMBA
Florentina RĂDOI

TRATAT DE BIOTEHNOLOGIE

VOL. I

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

137543
B.C.U. - IASI

EDITURA TEHNICA

București, 2004

Copyright © 2004, S.C. Editura TEHNICĂ S.A.
Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate editurii.

Adresă: **S.C. Editura TEHNICĂ S.A.**
Str. Olari, nr. 23, sector 2
cod 024056
București, România

www.tehnica.ro

Contribuția autorilor:

Prof. univ. dr. ing. **Ștefana Jurcoane**: cap. 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18
Cercet. pr. I **Elena Săsărman**: cap. 2, 3, subcap. 8.2, 9.2
Conf. univ. dr. **Ana Roșu**: cap. 23
Conf. univ. dr. **Alexandra Banu**: cap. 21, 22
Lector univ. dr. **Radiana Berehoiu Tamba**: cap. 20
Lector univ. dr. **Florentina Rădoi**: cap. 16, 19
Lector univ. **Irina Lupescu**: cap. 10
Asist. **Laura Dinu**: subcap. 13.5

coperta colecției
andrei**mănescu**

coordonator lucrare
cătălina**măgureanu**

coordonator tehnic
floringe**alapu**

procesare pc
margareta**chilim**

layout & pre-press
ioana**vasilescu**

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
Tratat de biotehnologie/ Ștefana Jurcoane, Elena Săsărman, Ana Roșu, ... - București: Editura Tehnică, 2004-
ISBN 973-31-2236-X
Vol. 1 - 2004 - Bibliogr. - ISBN 973-31-2235-1
I. Jurcoane, Ștefana
II. Săsărman, Elena
III. Roșu, Ana Claudia
57.62

Lucrare editată cu sprijinul
Ministerului Educației și Cercetării

Tiraj: 500
Preț editură: 192.000 lei

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUVÂNT ÎNAINTE

Rezultatele spectaculoase obţinute în ultimul timp în domeniul biologiei moleculare au pus bazele unor biotehnologii moderne cu impact economic şi social deosebit în viaţa cotidiană.

Bioprocesele constituie partea esenţială a unor procese specifice industriilor cum ar fi: chimice, alimentare, farmaceutice şi agroalimentare.

Dezvoltarea învăţământului biotehnologic necesită aprofundarea unor aspecte, prin aplicarea numeroaselor metode şi procedee noi, specifice biologiei moleculare, biologiei celulare, care conduc la îmbunătăţirea bioproceselor menţionate.

Descoperirile ştiinţifice din domeniul geneticii microorganismelor necesită o altfel de abordare a biotehnologiilor clasice. Procesele de biosinteză, realizate cu ajutorul microorganismelor, au cunoscut un ritm rapid de dezvoltare, datorită nevoilor tot mai mari ale omenirii de produse biologic active: aminoacizi, proteine, vitamine, antibiotice, produse agroalimentare şi furajere, enzime cu numeroase aplicaţii practice la nivel industrial etc., impunându-se obţinerea acestora cu randamente cât mai mari, prin metode nepoluante. Astfel, tehnologia ADN-recombinant reprezintă o cale de rentabilizare a tuturor proceselor din industria biotehnologică prin transferul genelor de interes la microorganismele producătoare. Pe de altă parte, tehnicile de inginerie genetică permit obţinerea de microorganisme capabile să metabolizeze deşeuri industriale din cele mai diverse, transformându-le, în final, în hrană şi energie.

În acest context, lucrarea de faţă, reuneşte aspecte esenţiale ale biotehnologiilor microbiene clasice, completate cu date recente referitoare la rentabilizarea acestora prin metodele ingineriei genetice. Volumul este

BUCUR CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

structurat în patru părţi, cuprinzând atât noţiuni de bază referitoare la biologia şi genetica microorganismelor, metabolismul microbian, cinetica proceselor de biosinteză, izolarea şi purificarea produselor, cât şi tipuri de procese biotehnologice. De asemenea, lucrarea cuprinde un capitol special de „Bioreactoare", în care sunt descrise utilajele de bază implicate în tehnologiile de biosinteză, aplicate la nivel pilot şi industrial.

Pe baza unei bogate experienţe de cercetare în domeniul biotehnologiei, autorii acestei lucrări au reuşit sintetizarea aspectelor de bază implicate în procesele biotehnologice.

Cu toate că lucrarea se adresează, în primul rând, studenţilor de la facultăţile care au în structura lor profilul „Biotehnologie", cred că va fi la fel de utilă şi specialiştilor dornici să aprofundeze cunoştinţele noi în domeniul biotehnologiei şi bioingineriei.

Prof. univ. dr. I. F. Dumitru
Facultatea de Biochimie
Universitatea din Bucureşti

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PREFAȚĂ

Utilizarea microorganismelor la transformarea materialelor biologice în produse alimentare fermentate își are originile în antichitate. De atunci, bioprocesele s-au dezvoltat enorm, fiind utilizate mai ales în scopul obținerii unor produse comerciale, din materii prime ieftine, rezultate de cele mai multe ori ca subproduse ale altor tehnologii. Datorită extraordinarei viteze de înmulțire a microorganismelor, biosinteza diferitelor clase de compuși chimici devine economică în comparație cu metodele de sinteză. Procedeele de biosinteză prezintă, de asemenea, avantajul de a se desfășura în condiții blânde de pH, temperatură, presiune, ceea ce conduce la evitarea coroziunii utilajelor și la costuri scăzute pentru combustibili și energie.

În țara noastră, industria de biosinteză s-a dezvoltat începând cu anul 1955, când s-a construit Fabrica de Antibiotice Iași. În afară de antibiotice, pe aceste instalații s-au mai produs în anumite perioade de timp: aminoacizi, (L-lizina), biostimulatori, vitamine, enzime (α-amilază). Ulterior, s-au construit fabricile „Bioproteine" Curtea de Argeș, producătoare de proteine din petrol, și apoi „Biosin" Calafat, profilată pe concentrate furajere (lizină, glutamat de sodiu, subtilază). Tehnologiile aplicate pe aceste instalații au fost elaborate de colective de cercetători aparținând unor instituții de profil și universități din București, Iași, Galați, Timișoara, Cluj. Aceste colective au contribuit, în același timp, la dezvoltarea învățământului biotehnologic în țara noastră prin înființarea de secții de profil în universități și implementarea metodelor moderne de investigație în domeniul biotehnologiei.

În aceste condiții lucrarea Tratat de biotehnologie *reprezintă o sinteză a principalelor aspecte legate de obținerea cu ajutorul microorganismelor a celor mai cunoscute clase de compuși organici (alcooli, acizi*

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

organici, aminoacizi, enzime, antibiotice) completate cu date ştiinţifice recent apărute în domeniu, în special metode referitoare la ridicarea capacităţii productive a tulpinilor producătoare prin metodele ingineriei genetice.

Lucrarea prezentată urmăreşte îndeaproape tematica cursurilor de Biotehnologie generală. Bioreactoare, Biotehnologia proteinelor şi enzimelor, Biotehnologii aplicate în industria medicamentelor, Toxicologie, Tehnologia culturilor celulare, *predate studenţilor din Facultatea de Biotehnologii, Universitatea de Ştiinţe Agronomice şi Medicină Veterinară, Bucureşti.*

Volumul cuprinde 23 de capitole structurate în patru părţi. În prima parte (capitolele 1–7) sunt prezentate noţiuni generale de biotehnologie, urmate de prezentarea, la începutul părţii a doua (capitolele 8, 9 şi 10) a unor procese biotehnologice tipice. O mare parte din lucrare cuprinde descrierea unor tehnologii de biosinteză, în care autorii posedă o vastă experienţă, căpătată de-a lungul anilor în domeniul biotehnologiei, în institute de cercetare din ţară: Institutul Naţional de Cercetare Dezvoltare Chimico-Farmaceutică (ICCF) Bucureşti, Institutul de Biologie al Academiei Române şi în străinătate: Japonia, Franţa, S.U.A.

Cartea păstrează schema de expunere şi elementele de bază cuprinse în volumul „Biotehnologii" (Editura Tehnică, 2000) fiind completată cu aspecte noi referitoare la enzime, antibiotice, degradare microbiană, ecologie, culturi de celule vegetale.

Lucrarea cuprinde atât date recente de literatură, cât şi date originale de cercetare. Prin tematica abordată şi tratarea la un nivel superior, ea vine în sprijinul specialiştilor, studenţilor, precum şi a celor interesaţi în probleme de biotehnologie.

Coordonator,
Prof. univ. dr. ing. Ştefana Jurcoane

BCU IAŞI

CUPRINS

Partea I. FUNDAMENTELE BIOTEHNOLOGIEI 17

1. BIOTEHNOLOGIA – ISTORIC, PROCESE ŞI PRODUSE BIOTEHNOLOGICE 19
1.1. Definiţia biotehnologiei; evoluţia în timp a biotehnologiei ca ştiinţă tehnică 19
1.2. Dezvoltarea industriei biotehnologice. Rolul cercetării fundamentale în biotehnologie 22
1.3. Aplicaţii ale biotehnologiei în medicină, agricultură, industria alimentară, industria farmaceutică 25

2. MICROORGANISME – GENERALITĂŢI 28
2.1. Caracterizarea microorganismelor de interes biotehnologic 28
2.1.1. Bacteriile (*Schizomycetes*) 31
2.1.2. Drojdiile 36
2.1.3. Fungii (*Mycophyta*) 38
2.1.4. Rolul şi utilizarea microorganismelor în biotehnologii 45
2.1.5. Microorganismele extremofile şi aplicaţiile lor în biotehnologii 48
2.2. Taxonomia şi nomenclatura 51
2.2.1. Clasificarea şi conceptul de specie 52
2.2.2. Taxonomia bacteriană convenţională 53
2.2.3. Chemotaxonomia 53
2.2.4. Taxonomia moleculară 56

3. METABOLISMUL MICROBIAN 65
3.1. Bazele metabolismului 65
3.1.1.Catabolismul 66
3.1.2. Anabolismul 67
3.2. Căi de degradare a substratului (catabolism) 68
3.2.1. Glicoliza 69
3.2.2. Calea hexozomonofosfaţilor 72
3.2.3. Conexiuni între calea glicolizei şi calea hexozomonofosfat 72
3.2.4. Calea Entner-Doudoroff sau calea 2-ceto-3-deoxigluconat 73
3.2.5. Ciclul acizilor tricarboxilici 75
3.3. Căi de biosinteză a constituenţilor celulari (anabolism) 77
3.3.1. Metaboliţii microbieni primari 78
3.3.2. Metaboliţii microbieni secundari 79
3.3.3. Trofofaza şi idiofaza 79
3.3.4. Relaţia între metabolismul primar şi secundar 80

BCU IAŞI – UNIVERSITY LIBRARY

3.4. Fermentații derivate din căile de biosinteză 81
3.4.1. Fermentații derivate din calea hexozomonofosfatului 81
3.4.2. Fermentații derivate din ciclul Krebs sau șuntul glioxilat 84
3.4.3. Degradarea microbiană a altor glucide (decât glucoza) 86

4. CINETICA PROCESELOR DE BIOSINTEZĂ 90
4.1. Dinamica multiplicării bacteriilor. Curba de creștere 90
4.1.1. Dinamica procesului de creștere la fungi 93
4.2. Influența factorilor de mediu asupra creșterii microorganismelor 94
4.2.1. Influența concentrației substratului asupra procesului de biosinteză 94
4.2.2. Influența dimensiunii inoculului 95
4.2.3. Efectul temperaturii asupra creșterii microorganismelor 96
4.2.4. Efectul *p*H-ului asupra creșterii microorganismelor 97
4.2.5. Concentrația de oxigen dizolvat 98

5. ETAPELE UNUI PROCES BIOTEHNOLOGIC 101
5.1. Faza de laborator 101
5.2. Faza de stație pilot 103
5.3. Medii de cultură 104

6. BIOREACTOARE 107
6.1. Stoechiometria proceselor de biosinteză 110
6.2. Modele matematice ale creșterii microbiene. Ecuația Monod 111
6.3. Concepte de bază în operarea bioreactoarelor 114
6.4. Caracterizarea bioreactoarelor 117
6.4.1. Bioreactorul discontinuu 117
6.4.2. Bioreactorul continuu 120
6.4.3. Bioreactorul cu recirculare externă 126
6.4.4. Bioreactorul ideal cu deplasare (*D*) (curgere tip piston) 128
6.4.5. Operarea bioreactoarelor în culturi extinse (cu adaosuri) 130
6.5. Configurația bioreactoarelor. Tipuri constructive 133
6.6. Descrierea bioreactoarelor pentru cultivare în sistem submers 139
6.6.1. Bioreactoare cu agitare mecanică 139
6.6.2. Bioreactoare cu agitare mecanică și cu draft interior 143
6.6.3. Bioreactoare cu aer comprimat 144
6.6.4. Bioreactoare cu dializă 144
6.7. Bioreactoare pentru culturi de suprafață 151
6.8. Bioreactoare cu enzime imobilizate 155
6.9. Alegerea bioreactoarelor 160

7. PRELUCRAREA MEDIILOR DE CULTURĂ ÎN SCOPUL IZOLĂRII ȘI PURIFICĂRII PRODUSELOR DE BIOSINTEZĂ 164
7.1. Filtrarea mediilor de biosinteză 165
7.2. Dezagregarea celulelor de microorganisme 166
7.3. Concentrarea mediilor de biosinteză a enzimelor 167
7.4. Uscarea prin atomizare a mediilor de fermentație cu activitate enzimatică 168

Partea a II-a. TIPURI DE PROCESE BIOTEHNOLOGICE 169

8. BIOPROCESE ANAEROBE 171
8.1. Fermentația alcoolică 172
8.2. Fermentația lactică. Probiotice 173
8.2.1. Microorganisme care produc fermentația lactică 174
8.2.2. Căile metabolice la bacteriiie lactice 175

8.2.3. Fermentaţia lactică, echipamente şi tehnologie 189
8.2.4. Tehnologia de obţinere a acidului lactic şi a sărurilor sale 192
8.2.5. Aplicaţii practice 200
8.2.6. Biosinteza bacteriocinelor 203
8.2.7. Probiotice 204

9. BIOPROCESE AEROBE 213
9.1. Obţinerea prin biosinteză a acizilor organici 213
9.1.1. Tehnologia acidului gluconic 214
9.1.2. Tehnologia obţinerii acidului citric 220
9.2. Biosinteza aminoacizilor 222
9.2.1. Biosinteza L-lizinei 223
9.2.2. Biosinteza acidului L-glutamic 249

10. ANTIBIOTICE 255
10.1. Noţiuni generale 255
10.1.1. Clasificarea antibioticelor 256
10.1.2. Rezistenţa la antibiotice 262
10.1.3. Producerea antibioticelor la scară industrială 264
10.2. Antibiotice β-lactamice 266
10.2.1. Peniciline 270
10.2.2. Cefalosporine 289
10.2.3. Carbapeneme 300
10.2.4. Monobactame 300
10.2.5. Inhibitori de β-lactamaze 301
10.3. Griseofulvina 302
10.3.1. Proprietăţi fizico-chimice 302
10.3.2. Tehnologia de obţinere a griseofulvinei 303
10.4. Antibiotice aminoglicozidice 304
10.4.1. Streptomicina 305
10.4.2. Neomicine şi paromomicine 310
10.4.3. Kanamicine 312
10.4.4. Gentamicina 313
10.5. Tetracicline 314
10.5.1. Proprietăţi fizico-chimice şi biologice 314
10.5.2. Obţinerea tetraciclinelor naturale 315
10.5.3. Proprietăţi farmaco-terapeutice ale tetraciclinelor naturale 317
10.5.4. Tetracicline de semisinteză 317
10.6. Macrolide şi cetolide 318
10.6.1. Eritromicina 320
10.6.2. Cetolide 321
10.6.3. Nistatina 322
10.7. Alte clase şi tipuri de antibiotice 324
10.7.1. Antibiotice oligozaharidice 324
10.7.2. Antibiotice peptidice 328
10.7.3. Rifamicine 331
10.7.4. Lincosamide 332
10.7.5. Fosfomicina 333
10.7.6. Mupirocina 333

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Partea a III-a. BIOTEHNOLOGIA ENZIMELOR 337

11. ENZIME DE FERMENTAȚIE – GENERALITĂȚI 339
11.1. Scurt istoric 338
11.2. Avantajele producerii enzimelor prin fermentație 342
11.3. Enzime microbiene cu aplicații industriale. Domenii de utilizare 344
11.2. Enzime intracelulare de fermentație 345
11.5. Enzime de fermentație, extracelulare 347
11.6. Enzime microbiene de uz biochimic 348

12. METODE DE BIOSINTEZĂ A ENZIMELOR 350
12.1. Microorganisme producătoare de enzime 350
12.2. Selecția tulpinilor și ameliorarea lor 352
12.2.1. Alegerea tulpinii producătoare de enzime 352
12.2.2. Ameliorarea tulpinilor de microorganisme 353
12.2.3. Creșterea producției de enzime prin ameliorarea tulpinilor 358

13. ENZIME AMILOLITICE 360
13.1. Modul de acțiune al enzimelor amilolitice asupra amidonului 361
13.2. Tehnologii de biosinteză a α-amilazelor 364
13.2.1. Biosinteza α-amilazelor bacteriene 364
13.2.2. Izolarea α-amilazelor din mediul de biosinteză 376
13.3. Tehnologii de biosinteză a β-amilazelor 377
13.3.1.Tulpini modificate genetic, producătoare de β-amilaze 378
13.3.2. Amiloglucozidaze 379
13.4. Hidroliza enzimatică a amidonului utilizând preparate amilolitice de origine microbiană 379
13.4.1. Parametrii de control ai hidrolizei enzimatice 380
13.4.2. Compoziția mediului de hidroliză 381
13.5. Enzime amilolitice active în domeniul de *p*H alcalin 383
13.5.1. Microorganisme producătoare 383
13.5.2. Proprietățile enzimelor alcaline care degradează amidonul 384
13.5.3. Tehnologia de biosinteză a amilazelor alcaline 387
13.5.4. Aplicațiile amilazelor alcaline 392

14. ENZIME CELULOZOLITICE 394
14.1. Microorganisme producătoare de celulaze 394
14.2. Hidroliza enzimatică a celulozei utilizând preparate celulozolitice de origine microbiologică 395
14.2.1. Procedeul I.F.P. de transformare a biomasei ligno-celulozice 397
14.2.2. Pretratări ale substratului ligno-celulozic 398
14.3. Producția de enzime celulozolitice 400
14.4. Aplicații ale celulazelor și hemicelulazelor 403

15. ENZIME PROTEOLITICE 405
15.1. Generalități asupra enzimelor proteolitice 405
15.2. Enzime implicate în degradarea proteinelor 406
15.2.1.Clasificarea enzimelor proteolitice 406
15.3. Mecanismul procesului de hidroliză enzimatică a proteinelor 409
15.3.1. Generalități privind cataliza enzimatică 409
15.3.2. Mecanismul de acțiune al proteazelor 412
15.4. Microorganisme producătoare de enzime proteolitice 417

15.5. Structura şi proprietăţile enzimelor proteolitice microbiene 420
15.5.1. Proteaze bacteriene biosintetizate de *Bacillus subtilis* 421
15.5.2. Proteaze fungice din *Aspergillus oryzae* 426
15.6. Metode de izolare şi selecţie a microorganismelor producătoare de enzime proteolitice 427
15.6.1. Metoda inoculării pe un mediu minimal 427
15.6.2. Metoda difuziei radiale 428
15.6.3. Mutageneza 430
15.6.4. Fuziunea de protoplaşti 433
15.6.5. Metode de inginerie genetică 434
15.7. Biosinteza proteazelor bacteriene în sistem submers 441
15.7.1. Medii de cultură 442
15.7.2. Parametrii de cultivare 444
15.7.3. Dinamica biosintezei proteazelor neutre cu tulpini de *Bacillus subtilis* 448
15.7.4. Caracterizarea biochimică a proteazelor extracelulare produse cu tulpini de *Bacillus subtilis* 449
15.8. Biosinteza proteazelor fungice 453
15.8.1. Medii de cultură 453
15.8.2. Condiţii de cultivare 455
15.8.3. Dinamica biosintezei enzimelor proteolitice în culturi submerse de *Aspergillus oryzae* 456
15.8.4. Procedee de izolare şi purificare a enzimelor proteolitice fungice 457

16. ENZIME PECTINOLITICE 473
16.1. Introducere 473
16.2. Clasificarea şi caracterizarea enzimelor pectinolitice 475
16.3. Microorganisme producătoare de enzime pectinolitice 477
16.4. Metodologia generală de producere a enzimelor pectinolitice industriale 478
16.4.1. Întreţinerea şi conservarea tulpinilor 480
16.4.2. Prepararea inoculului 481
16.4.3. Faza de bioproces 481
16.4.4. Extracţia şi izolarea enzimelor pectinolitice 482
16.4.5. Purificarea preparatelor enzimatice pectinolitice 482
16.4.6. Condiţionarea preparatelor cu activitate pectinolitică 482
16.4.7. Fluxul tehnologic de obţinere a enzimelor pectinolitice 483
16.5. Caracteristicile fizico-chimice şi biochimice ale enzimelor pectinolitice 484
16.5.1. Pectinesterazele 484
16.5.2. Poligalacturonazele 485
16.5.3. Liazele 487
16.6. Domenii de utilizare ale enzimelor pectinolitice 488

17. ENZIME LIPOLITICE 495
17.1. Obţinerea lipazelor din culturi microbiene 495
17.1.1. Microorganisme producătoare de lipaze 495
17.1.2. Obţinerea lipazelor în culturi submerse 497
17.1.3. Purificarea şi caracterizarea lipazelor microbiene 500
17.2. Aplicaţii ale lipazelor microbiene 501

18. GLUCOZOXIDAZA 503
18.1. Generalităţi. Oxidarea enzimatică a glucozei 503
18.2. Microorganisme producătoare de glucozoxidază 506

BCU UNIVERSITY LIBRARY

18.3. Biocinetica producerii glucozoxidazei în culturile cu tulpini de *Aspergillus niger* 508
18.3.1. Întreținerea și conservarea tulpinilor de *A. niger* 509
18.3.2. Prepararea inoculului pe mediu solid 510
18.3.3. Dezvoltarea inoculului vegetativ 510
18.3.4. Faza de bioproces 510
18.4. Extracția și izolarea glucozoxidazei din micelii de *Aspergillus niger* 512
18.5. Purificarea preparatelor enzimatice cu activitate glucozoxidazică 513
18.6. Condiționarea prin liofilizare a preparatelor enzimatice de glucozoxidază 515
18.7. Proprietățile glucozoxidazei din tulpini de *Aspergillus niger* 515
18.8. Fluxul tehnologic de obținere a glucozoxidazei din tulpini de *Aspergillus niger* 516
18.9. Caracteristicile fizico-chimice și biochimice ale preparatului purificat de glucozoxidază 518
18.10. Domenii de utilizare a glucozoxidazei 518

19. INVERTAZA 520
19.1. Generalități; conversia enzimatică a zaharozei 520
19.2. Microorganisme producătoare de invertază 521
19.3. Biocinetica obținerii invertazei în culturi submerse cu *Saccharomyces cerevisiae* 522
19.3.1. Întreținerea și conservarea tulpinilor 522
19.3.2. Prepararea inoculului 522
19.3.3. Faza de bioproces 523
19.4. Extracția și izolarea invertazei din biomasa de drojdii 523
19.5. Purificarea preparatelor enzimatice cu activitate invertazică 524
19.6. Condiționarea preparatelor cu activitate invertazică 524
19.7. Fluxul tehnologic de obținere a invertazei din tulpini de *Saccharomyces cerevisiae* 525
19.8. Caracteristicile fizico-chimice și biochimice ale preparatelor purificate de invertază 526
19.9. Domenii de utilizare a invertazei 527

Partea a IV-a. IMPLICAȚII ALE BIOTEHNOLOGIEI ÎN ALTE DOMENII 529

20. TOXICOLOGIE BIOTEHNOLOGICĂ 531
20.1. Metaboliți toxici ai microorganismelor utilizate în biotehnologii sau ai florei de contaminare 534
20.2. Compuși toxici sintetizați pe parcursul proceselor biotehnologice 548
20.3. Efectele toxinelor preexistente în materiile prime utilizate în biotehnologii 555
20.4. Toxicitatea unor aditivi ai produselor biotehnologice 563
20.5. Aspecte toxice determinate de nerespectarea parametrilor tehnologici 568
20.6. Substanțe toxice ajunse în produsele biotehnologice ca poluanți chimici 569
20.7. Toxicitatea ambalajelor produselor biotehnologice 572
20.8. Profilaxia fenomenelor toxice și detoxifierea în organismele vii 573
20.9. Impactul produselor biotehnologice asupra consumatorilor 575

21. DEGRADAREA MICROBIANĂ A MATERIALELOR 577
21.1. Introducere 577
21.2. Evoluția și diversitatea microorganismelor 578

21.3. Biofilme microbiene 578
21.3.1. Influenţa biofilmelor asupra funcţionalităţii sistemelor tehnologice nebiologice 580
21.4. Degradarea microbiologică a maselor plastice (polimeri artificiali) şi a polimerilor naturali (biopolimeri) 580
21.4.1. Mecanismul degradării 581
21.5. Biodegradarea materialelor ceramice 583
21.5.1. Biodegradarea sticlei 583
21.5.2. Biodegradarea betonului 584
21.6. Coroziunea microbiologică a metalelor 585
21.6.1. Coroziunea aerobă 585
21.6.2. Coroziunea anaerobă 587
21.7. Noţiuni de termodinamica coroziunii microbiologice 590
21.7.1. Coroziunea electrochimică a oţelului 591
21.7.2. Creşterea electrochimică a microorganismelor 593
21.8. Măsuri de protecţie anticorozivă 597
21.9. Depoluarea biologică 598
21.9.1. Principalii parametri tehnologici ai unui procedeu de depoluare biologică 598
21.9.2. Activarea şlamului 600

22. NOŢIUNI DE ECOLOGIE **601**
22.1. Introducere 601
22.2. Organizarea sistemică a lumii vii 601
22.2.1. Generalităţi 601
22.2.2. Emergenţa sistemelor 604
22.2.3. Trăsăturile ecologice ale biosistemelor 606
22.2.4. Sisteme disipative-deschise 607
22.3. Factorii ecologici şi legile fundamentale ale acţiunii acestora 608
22.3.1. Legile de acţiune ale factorilor ecologici 608
22.3.1. Clasificarea factorilor ecologici 609
22.4. Organizarea lumii vii 612
22.4.1. Biocenoza 613
22.4.4. Ecosistemul 617
22.5. Sistemele vii ca structuri disipative 619
22.6. Ecologia antroposferei 620
22.6.1. Ecosisteme antropice 621
22.6.2. Problema resurselor naturale 623
22.6.3. Ciclurile materiei 624
22.7. Interdependenţa antroposferă–mediu 625
22.7.1. Schimbul de materie şi energie dintre om şi mediu 625
22.7.2. Agenţi ai mediului 626

23. COMPUŞI FITOCHIMICI INDUSTRIALI: ABORDĂRI BIOTEHNOLOGICE **631**
23.1. Plantele – surse consacrate de compuşi farmaceutici, aromatici şi industriali 631
23.2. Semnificaţia biologică a metaboliţilor primari şi secundari 633
23.2.1. Paradigma metabolismului secundar în celulele vegetale; abordări biotehnologice 639
23.3. Diferenţiere celulară şi totipotenţă în culturi de celule vegetale 640

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

23.4. Calusuri şi culturi celulare în suspensie 642
23.5. Variabilitatea somaclonală în culturile de calus şi de celule în suspensie 645
23.5.1. Selecţia *in vitro* de linii celulare 648
23.6. Manipularea metabolismului secundar în condiţii in vitro prin modificarea mediului fizic şi chimic 651
23.6.1. Alegerea sistemului de cultură 651
26.6.2. Limitarea nutrienţilor 653
23.6.3. Reglatorii creşterii 654
23.6.4. Elicitarea 655
23.6.5. Utilizarea precursorilor 655
23.6.6. Lumina, *p*H-ul, temperatura şi mediul gazos 655
23.7. Culturi de rădăcini firoase (*hairy roots*) obţinute prin transformare cu Agrobacterium rhizogenes 656
23.8. Manipularea genomului folosind tehnologia ADN recombinant 657
23.9. Ingineria metabolică la plante 658
23.10. Agricultura moleculară 659
23.11. Cercetări originale privind producerea de metaboliţi secundari în culturi *in vitro* la *Rubia Tinctorum* 661

BIBLIOGRAFIE *667*

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Partea I

FUNDAMENTELE BIOTEHNOLOGIEI

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- **BIOTEHNOLOGIA – ISTORIC, PROCESE ŞI PRODUSE BIOTEHNOLOGICE**
- **MICROORGANISME – GENERALITĂŢI**
- **METABOLISMUL MICROBIAN**
- **CINETICA PROCESELOR DE BIOSINTEZĂ**
- **ETAPELE UNUI PROCES BIOTEHNOLOGIC**
- **BIOREACTOARE**
- **PRELUCRAREA MEDIILOR DE CULTURĂ ÎN SCOPUL IZOLĂRII ŞI PURIFICĂRII PRODUSELOR DE BIOSINTEZĂ**

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1. BIOTEHNOLOGIA – ISTORIC, PROCESE ŞI PRODUSE BIOTEHNOLOGICE

1.1. DEFINIŢIA BIOTEHNOLOGIEI; EVOLUŢIA ÎN TIMP A BIOTEHNOLOGIEI CA ŞTIINŢĂ TEHNICĂ

Descoperirile spectaculoase din domeniile biologiei, biochimiei, microbiologiei, geneticii, enzimologiei, precum şi necesitatea aplicării acestor cunoştinţe în practică au condus la apariţia unei noi ştiinţe denumită generic „biotehnologie". Caracterul interdisciplinar al biotehnologiei a creat încă de la început probleme privind definirea şi localizarea ei ca ştiinţă de sine stătătoare.

Cuvântul „biotehnologie" este format din doi termeni: „bio" venind de la grecescul „bios", însemnând „viaţă" şi din care a derivat mai târziu cuvântul „biologie", şi „tehnologie" venind de la grecescul „technologia", însemnând „studiul tehnic al utilajelor, maşinilor, materialelor". Dacă biologia a fost la început o ştiinţă a naturii, o ştiinţă de laborator, biotehnologia este acum o ştiinţă pluridisciplinară, tehnică – „ştiinţa inginerului". Biotehnologia utilizează materia vie pentru degradarea, sinteza şi producerea de materiale (prin bioconversie–biosinteză) în scopul unei activităţi agronomice sau industriale, acompaniind în final un progres social şi economic. Ea apelează pe scară largă la enzime libere sau fixate, la microorganisme, structuri celulare şi subcelulare active (biocatalizatori, anticorpi) la o inginerie sofisticată.

Dintre toate definiţiile, aceea dată biotehnologiei de către Federaţia Europeană de Biologie (1978), pare a fi satisfăcătoare:

„Utilizarea integrată a biochimiei, microbiologiei şi ingineriei în scopul obţinerii unei aplicaţii tehnologice (industriale), cu ajutorul microorganismelor, culturilor de celule şi a părţilor componente ale acestora".

Deci, în esenţă, principalul scop al biotehnologiei este obţinerea de produse sau servicii utile activităţii umane, cu ajutorul organismelor vii.

Procesul de bază în biotehnologie este „proces biologic", după cum procesul de bază în tehnologia chimică este „proces chimic".

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

În tabelul 1.1 poate fi urmărită natura produselor comerciale obținute pe cale biotehnologică utilizând diferite tipuri de celule.

Tabelul 1.1

Produse majore obținute pe cale biotehnologică

Produse de fermentație	Tipul de organism utilizat	Producție anuală (în lume) [kg/an]
1	2	3
Solvenți organici Etanol (nu pentru băuturi) Acetonă/butanol	*Sacharomyces cerevisiae* *Clostridium acetobutylicum*	$2 \cdot 10^{10}$ $2 \cdot 10^{6}$ (butanol)
Biomasă Culturi starter și drojdii pentru industria alimentară și agricultură Proteine monocelulare	Bacterii lactice sau drojdii de panificație *Pseudomonas methylotrophus* sau *Candida utilis*	$5 \cdot 10^{8}$ $0{,}5–1 \cdot 10^{8}$
Acizi organici Acid citric Acid gluconic Acid lactic Acid itaconic	*Aspergillus niger* *Aspergillus niger* *Lactobacillus delbrueckii* *Aspergillus itaconicus*	$2–3 \cdot 10^{8}$ $5 \cdot 10^{7}$ $2 \cdot 10^{7}$
Aminoacizi Acid L-glutamic L-Lysină L-Fenilalanină L-Arginină Alți aminoacizi	*Corynebacterium glutamicum* *Brevibacterium flavum* *Corynebacterium glutamicum* *Brevibacterium flavum* *Corynebacterium spp.*	$3 \cdot 10^{8}$ $3 \cdot 10^{7}$ $2 \cdot 10^{6}$ $2 \cdot 10^{6}$ $1 \cdot 10^{6}$
Transformări microbiene Steroizi D-Sorbitol la L-sorboză (în producția de vitamina C)	*Rhizopus arrhizus* *Acetobacter suboxydans*	$4 \cdot 10^{7}$
Polizaharide extracelulare Xanthan Dextran	*Xanthomonas campestris* *Leuconostoc mesenteroides*	$5 \cdot 10^{6}$
Nucleotide 5'- Guanosin monofosfat	*Brevibacterium ammoniagenes*	$1 \cdot 10^{5}$

Tabelul 1.1 (continuare)

1	2	3
Enzime		
Proteaze	*Bacillus* sp.	$6 \cdot 10^5$
α-Amilaze	*Bacillus amyloliquefaciens*	$4 \cdot 10^5$
Glucoamilaze	*Aspergillus niger*	$4 \cdot 10^5$
Glucozizomerază	*Bacillus coagulans*	$1 \cdot 10^5$
Pectinaze	*Aspergillus niger*	$1 \cdot 10^4$
Rennină	*Mucor miehei* sau drojdie recombinantă	$1 \cdot 10^4$
Toate celelalte enzime		$5 \cdot 10^4$
Vitamine		
B_{12}	*Propionibacterium shermanii* sau *Pseudomonas denitrificans*	$1 \cdot 10^4$
Riboflavină	*Eremothecium ashbyii*	
Alcaloide Ergot	*Claviceps paspali*	$5 \cdot 10^3$
Pigmenţi		
Shikonin	*Lithosphermum erythrorhizon* (culturi de celule vegetale)	60
β-Caroten	*Blakeslea trispora*	
Vaccinuri împotriva:		
– difteriei	*Corynebacterium diphtheriae*	< 50
– tetanosului	*Clostridium tetani*	
– pertussisului (tusea convulsivă)	*Bordetella pertussis*	
– virusului poliomielitei	Viruşi activi atenuaţi crescuţi în rinichi de maimuţă sau în celulele diploide umane	
– rubeolei	Viruşi activi atenuaţi crescuţi în rinichi de hamster tânăr	
– hepatitei B	Antigen de suprafaţă evidenţiat în drojdia recombinată	
Proteine terapeutice		
Insulina	*Escherichia coli* recombinată	< 20
Hormonul creşterii	*Escherichia coli* recombinată sau celule de mamifere recombinate	
Eritropoietina	Celule de mamifere recombinate	
Factorul VIII-C	Celule de mamifere recombinate	
Activatorul plasminogen de ţesut	Celule de mamifere recombinate	
Interferonul-α_2	Recombinanţi de *Escherichia coli*	

BUAT / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 1.1 (continuare)

1	2	3
Insecticide Spori bacterieni Spori de fungi	 *Bacillus thuringiensis* *Hirsutella Thompsonii*	
Antibiotice Peniciline Cefalosporine Tetracicline (exemplu:7-clortetraciclina) Antibiotice macrolide (exemplu: eritromicina) Antibiotice polipeptide (exemplu: gramicidina) Antibiotice aminoglicoside (exemplu: streptomicina) Antibiotice aromatice (exemplu: griseofulvina)	 *Penicillium chrysogenum* *Cephalosporium acremonium* *Streptomyces aureofaciens* *Streptomyces erythreus* *Bacillus brevis* *Streptomyces griseus* *Penicillium griseofulvum*	 $3–4 \cdot 10^7$ $1 \cdot 10^7$ $1 \cdot 10^7$ $2 \cdot 10^6$ $1 \cdot 10^6$
Anticorpi monoclonali	Celule Hybridoma	< 20

1.2. DEZVOLTAREA INDUSTRIEI BIOTEHNOLOGICE. ROLUL CERCETĂRII FUNDAMENTALE ÎN BIOTEHNOLOGIE

Cunoaşterea ştiinţifică şi strategia de dezvoltare economică actuală se bazează pe o nouă abordare a fenomenelor, acestea conducând la o adevărată revoluţie biotehnologică. Se apreciază că în viitor cea mai mare parte a industriei se va baza pe procedee de fermentaţie, inginerie biochimică, biologie moleculară, aceasta din urmă imprimând un salt tehnologic corespunzător. Pe aceste baze, industria biotehnologică va lua un avânt considerabil.

Ingineria genetică este considerată a fi tehnica ideală capabilă să amelioreze cantitativ şi calitativ capacitatea de biosinteză a celulelor de microorganisme, animale sau vegetale, în scopul obţinerii unor produse utile.

Natura interdisciplinară a biotehnologiei este evidentă dacă se ţine seama de etapele unui proces biotehnologic complet. Dacă se ia ca exemplu obţinerea unui produs nou ADN-recombinant, cum ar fi insulina, hormonul de creştere sau interferonul, atunci, de la idee până la obţinerea unui produs comercial, se parcurg

mai multe faze care implică cunoştinţe aparţinând unor domenii ştiinţifice foarte diferite (fig. 1.1).

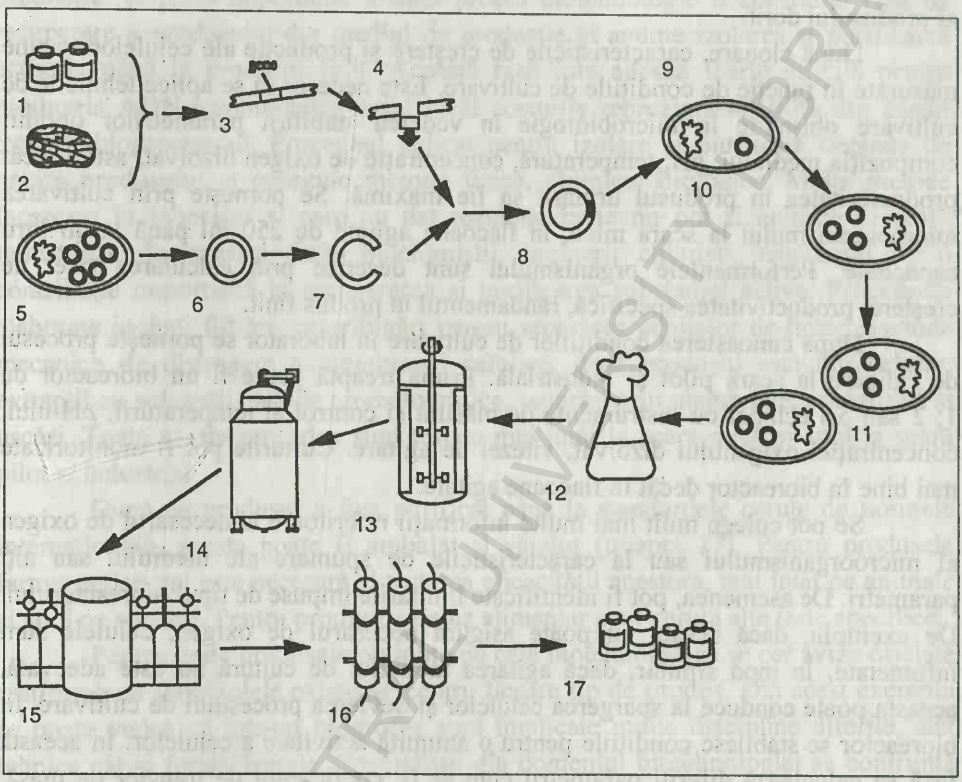


Fig. 1.1. Treptele unui proces biotehnologic complet de obţinere a noi produse aplicând tehnica ADN-recombinant:
1 – substanţe chimice; *2* – ţesut animal; *3* – cromozom animal; *4* – genă tăiată dintr-un cromozom; *5* – microorganism, ca de exemplu *E. coli*; *6* – plasmidă; *7* – plasmidă secţionată; *8* – plasmidă recombinant; *9* – introducere în microorganism; *10* – multiplicarea plasmidei şi expresia genei; *11* – diviziune celulară; *12* – cultivare în laborator; *13* – bioreactor de laborator; *14* – bioreactor pilot; *15* – operare la scară industrială; *16* – recuperarea produsului; *17* – condiţionare şi vânzare.

Prima treaptă de dezvoltare a bioprocesului se referă la manipularea genetică a organismului gazdă; în acest caz, o genă din ADN-ul animal este clonată într-o celulă de *Escherichia coli*. Aceste operaţii aparţinând domeniului ingineriei genetice sunt realizate în laborator de către oameni de ştiinţă instruiţi în domeniul biologiei moleculare şi biochimiei. Instrumentele utilizate în această fază constau în plăci Petri, micropipete, microcentrifuge, enzime de restricţie în cantităţi foarte

mici (de ordinul nano- ori microgramelor), geluri de electroforeză pentru separarea şi identificarea ADN-ului. Parametrii cei mai importanţi în acest stadiu al cercetării fundamentale sunt: stabilitatea tulpinii recombinant obţinute şi nivelul de expresie al produsului dorit.

După clonare, caracteristicile de creştere şi producţie ale celulelor trebuie măsurate în funcţie de condiţiile de cultivare. Este necesar să se aplice tehnicile de cultivare obişnuite în microbiologie în vederea stabilirii parametrilor optimi: compoziţia mediului, *p*H, temperatură, concentraţie de oxigen dizolvat, astfel încât productivitatea în produsul urmărit să fie maximă. Se porneşte prin cultivarea microorganismului la scara mică, în flacoane agitate de 250 ml până la un litru capacitate. Performanţele organismului sunt descrise prin calcularea ratei de creştere, productivitatea specifică, randamentul în produs finit.

După cunoaşterea condiţiilor de cultivare în laborator se porneşte procesul de ridicare la scară pilot şi industrială. Prima treaptă poate fi un bioreactor de 1; 2 sau 5 l echipat cu instrumente de măsură şi control al temperaturii, *p*H-ului, concentraţiei oxigenului dizolvat, vitezei de agitare. Culturile pot fi monitorizate mai bine în bioreactor decât în flacoane agitate.

Se pot culege mult mai multe informaţii referitoare la necesarul de oxigen al microorganismului sau la caracteristicile de spumare ale mediului sau alţi parametri. De asemenea, pot fi identificate limitările impuse de tipul bioreactorului. De exemplu, dacă acesta nu poate asigura necesarul de oxigen, celulele sunt înfometate. În mod similar, dacă agitarea mediului de cultură nu este adecvată, aceasta poate conduce la spargerea celulelor şi devierea procesului de cultivare. În bioreactor se stabilesc condiţiile pentru o anumită activitate a celulelor. În această fază se calculează diferiţi parametrii cum ar fi: coeficienţii de transfer de masă, timpul de agitare, viteza de dizolvare a oxigenului, puterea de agitare şi mulţi alţii. Aici se decide dacă cultura de celule poate fi operată cel mai bine în sistem *batch*, semicontinuu sau continuu. De asemenea, pot fi încercate diferite tipuri de bioreactor. Se realizează, de asemenea, un calcul economic de fezabilitate.

Următoarea treaptă de ridicare la scară (notată cu *14* în fig. 1.1) este aceea de bioreactor pilot. În această fază se implică specialiştii instruiţi în ingineria bioproceselor şi în ridicarea la scară industrială a acestora. Acum se construiesc bioreactoare de 100–1000 l după specificaţiile prototipului de laborator. Scopul fazei pilot este acela de a examina răspunsul celulelor cultivate la o scară mai mare. În această treaptă de operare, rezultatele pot fi mai bune sau mai scăzute faţă de cele obţinute în bioreactorul-laborator. În funcţie de aceste rezultate se hotărăşte dacă se trece la producţia industrială sau nu (treapta *15*). Această parte a procesului tehnologic aparţine în întregime ingineriei bioproceselor. Acum se proiectează atât bioreactorul industrial, cât şi facilităţile auxiliare: echipamente de sterilizare aer şi mediu, generator de abur, utilaje necesare preparării mediilor de cultură, sistem de

apă de răcire, aparatură de automatizare şi control. O importanţă deosebită se acordă faptului că instalaţia trebuie să asigure condiţii aseptice pe întreg fluxul de producţie. O parte importantă a unui proces biotehnologic o constituie faza de recuperare a produsului din mediul de producţie şi anume izolarea şi purificarea acestuia până la produsul finit. Această fază este adesea foarte dificilă pentru produsele ADN-recombinate, astfel încât costurile reprezintă 80–90% din costul total al bioprocesului. Procedeul aplicat pentru izolare şi purificare depinde de natura produsului şi cuprinde metode fizice, chimice, biologice. Multe metode încercate în laborator şi care au dat rezultate bune nu pot fi aplicate la scară industrială. În această fază, biochimiştii, inginerii chimişti, tehnologii au o contribuţie importantă în recuperarea şi purificarea substanţei active. Procedeele elaborate includ: filtrări, centrifugări pentru separarea celulelor de lichid, metode mecanice de distrugere a membranei celulare, dacă produsul este intracelular, extracţii cu solvenţi, metode cromatografice, separări prin membrane, cristalizări şi uscări. Toate aceste procedee sunt testate mai întâi la scara mică şi apoi la scară pilot şi industrial.

După ce produsul a fost purificat până la standardele cerute de normele internaţionale, acesta poate fi ambalat şi vândut (treapta *17*). Pentru produsele farmaceutice noi este necesară şi testarea eficacităţii acestora, mai întâi pe animale şi apoi pe oameni. Pentru produsele de uz alimentar sunt cerute alte teste specifice.

Pentru toate produsele obţinute pe cale biotehnologică se cer avize oficiale conforme cu standardele existente pentru fiecare tip de produs. Din acest exemplu se poate vedea că într-un bioproces sunt implicate multe discipline diferite, atât tehnice cât şi fundamentale. Specialiştii din domeniul biotehnologiei se confruntă în mod constant cu probleme aparţinând domeniilor: biologie, chimie, fizică, inginerie şi medicină.

1.3. APLICAŢII ALE BIOTEHNOLOGIEI ÎN MEDICINĂ, AGRICULTURĂ, INDUSTRIA ALIMENTARĂ, INDUSTRIA FARMACEUTICĂ

Sfera domeniilor de aplicabilitate a biotehnologiilor este foarte mare, dată fiind varietatea proceselor biotehnologice.

Principalele direcţii de dezvoltare a biotehnologiilor moderne sunt determinate, în primul rând, de descoperirile recente din domeniul biologiei moleculare, iar în al doilea rând de cerinţele societăţii faţă de anumite aspecte cu care se confruntă în prezent: criza energetică, epuizarea rezervelor de hrană de pe planetă, probleme ecologice şi de bioremediere.

Încercând o clasificare a diferitelor tipuri de biotehnologii, în funcție de domeniul în care se aplică sau de tipul de celule utilizate, observăm că este greu să realizăm o delimitare. Orice manipulare a viului în folosul societății înseamnă biotehnologie. Indiferent dacă aceasta se realizează la nivel de laborator, având un caracter de cercetare fundamentală, sau la nivel industrial, având un caracter aplicativ, scopul final şi în general tehnicile sunt asemănătoare şi incluse în aceeaşi sferă largă a biotehnologiei.

În funcție de tipul de celule cu care se lucrează, deosebim: biotehnologii: *microbiene*, *vegetale* şi *animale*.

În funcție de domeniul în care îşi găsesc aplicații produsele obținute pe cale biotehnologică deosebim:

- *biotehnologii industriale* (farmaceutice, alimentare şi de depoluare);
- *biotehnologii agricole* (vegetale şi în zootehnie);
- *biotehnologii medical-veterinare*.

Biotehnologiile industriale cuprind procedee de obținere a unor produse de larg interes, la nivel industrial, utilizând microorganisme sau enzime. În categoria biotehnologiilor farmaceutice intră:

- producerea de biomasă proteică;
- biosinteza antibioticelor;
- producția de acizi organici;
- producția de: aminoacizi, enzime, obținerea de probiotice, hormoni, vitamine, polizaharide.

În funcție de gradul de puritate, produsele obținute pot fi utilizate atât pentru consumul uman cât şi pentru cel animal.

Biotehnologiile alimentare cuprind procedee industriale de prelucrare a legumelor şi fructelor, a laptelui şi produselor lactate, a cărnii, vizând, în general, aspectele fermentative ale acestora.

În cadrul biotehnologiilor de depoluare a mediului sunt incluse toate metodele şi tehnicile de epurare biologică a apelor uzate sau poluate, a aerului sau a solurilor degradate, extracția de minereuri cu ajutorul microorganismelor.

Biotehnologiile agricole vizează un domeniu larg şi anume acela referitor la manipularea celulelor vegetale şi în acest caz le denumim biotehnologii vegetale (*plant biotechnology*) sau a celor animale (*animale biotechnology*). În acest din urmă caz deosebim: biotehnologii în zootehnie şi biotehnologii medical-veterinare, acestea putând fi clasificate separat.

Biotehnologiile vegetale studiază aspecte privind rezistența plantelor la atacul factorilor patogeni şi ale toleranței față de factori de mediu defavorabili, implementarea de sisteme simbiotice la diferite specii de plante, multiplicarea speciilor horticole şi obținerea de noi hibrizi sexuați.

Biotehnologiile din domeniul zootehniei se referă în special la: nutriţia animală; creşterea rezistenţei animalelor la atacul factorilor patogeni; biotehnici de reproducţie artificială şi de predeterminare a sexului la animale; conservarea resurselor genetice animale.

Biotehnologiile medical-veterinare au ca scop, în principal, crearea unor sisteme de diagnostic rapid şi eficient al maladiilor sau dereglărilor funcţionale la om şi la animale, producerea unor sisteme biologice de combatere a bolilor (anticorpi monoclonali, vaccinuri şi bacterii antagoniste).

Este necesar de remarcat faptul că saltul ştiinţific înregistrat în fiecare din domeniile biotehnologiei, enunţate anterior, nu ar fi fost posibil fără aplicarea tehnicilor noi de biologie moleculară, mai concret de inginerie genetică. Aceasta utilizează transferul de gene şi clonarea moleculară pentru obţinerea unor noi tipuri de celule şi organisme; astfel este posibilă obţinerea de linii celulare noi, pentru medicină, agricultură, zootehnie, industria alimentară. Încorporarea unor gene dorite, utile, conduce la obţinerea unor produse noi de interes medical sau industrial.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. MICROORGANISME – GENERALITĂȚI

2.1. CARACTERIZAREA MICROORGANISMELOR DE INTERES BIOTEHNOLOGIC

Unul dintre domeniile cele mai provocatoare ale microbiologiei este biotehnologia. În sensul larg al cuvântului, biotehnologia presupune folosirea microorganismelor în procesele aplicate industrial. În prezent prin biotehnologie se înțelege aplicarea tehnicilor geneticii moleculare în scopul construirii de noi microoorganisme capabile să sintetizeze produse cu o valoare comercială ridicată. În acest sens, biotehnologia este dependentă de ingineria genetică, disciplină care se referă la manipularea genelor și a produsului acestora.

Diversitatea microorganismelor implicate în biotehnologii este extrem de mare, cuprinzând reprezentanți atât dintre procariote (bacterii), cât și eucariote (drojdii sau fungi).

Studiile efectuate pe secvențe de ARN ribozomal au permis stabilirea a trei direcții distincte de evoluție, două aparținând structurii de tip procariot și una de tip eucariot (fig. 2.1.)

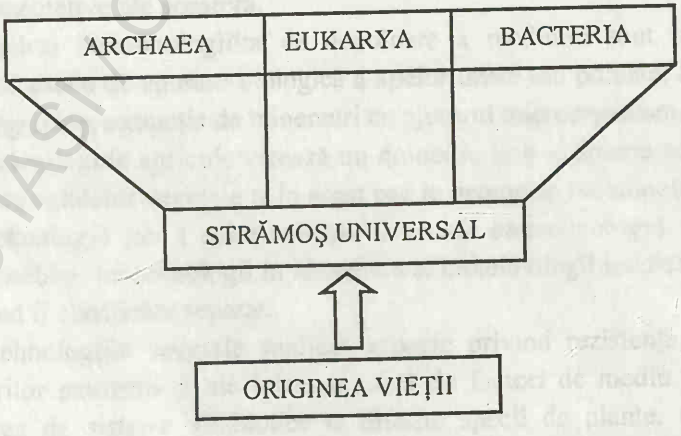


Fig. 2.1. Evoluția microorganismelor bazată pe secvențierea ARN*r*.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

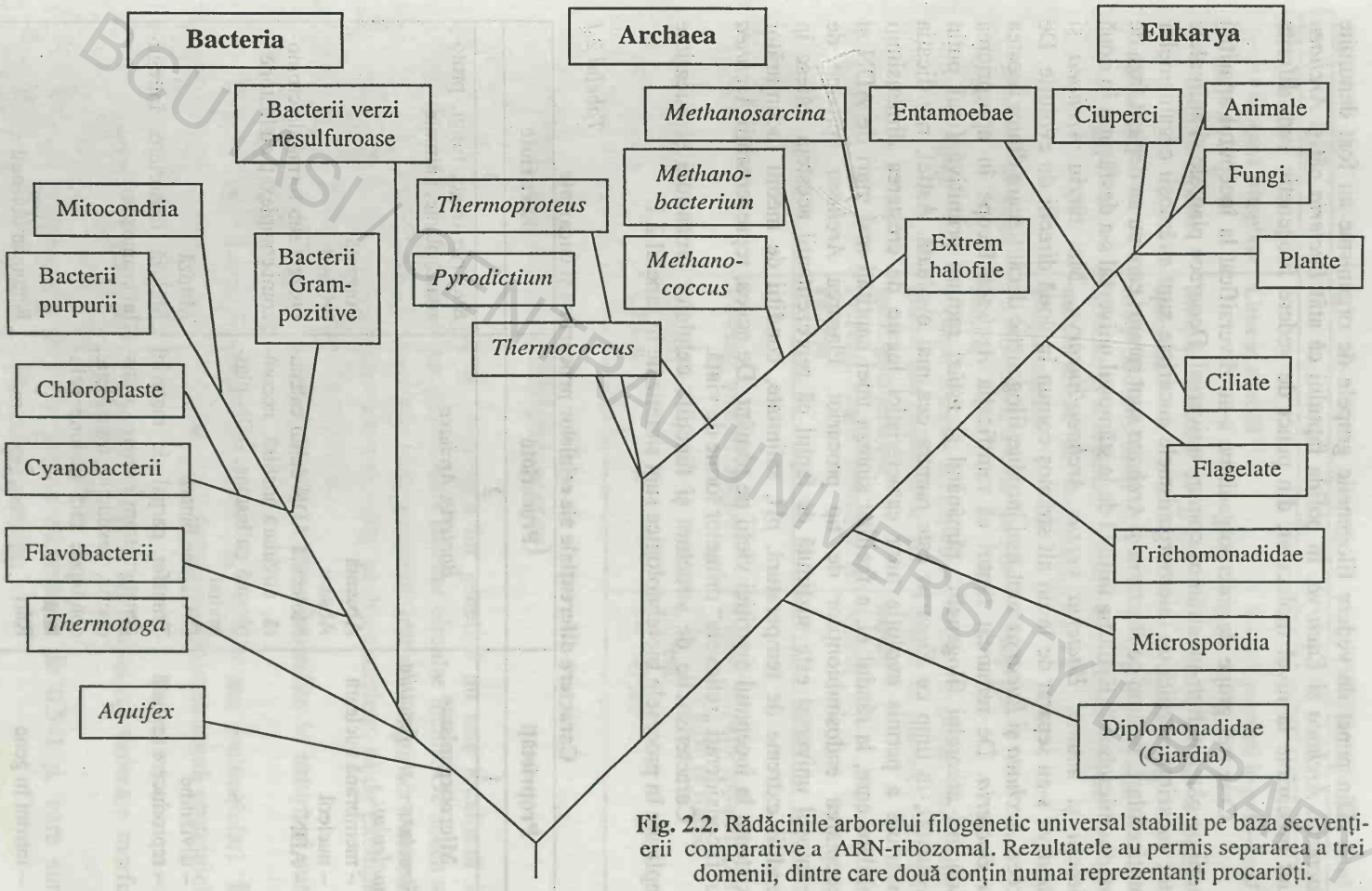


Fig. 2.2. Rădăcinile arborelui filogenetic universal stabilit pe baza secvenţierii comparative a ARN-ribozomal. Rezultatele au permis separarea a trei domenii, dintre care două conţin numai reprezentanţi procarioţi.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din punct de vedere filogenetic grupele de organisme au fost denumite *Bacteria*, *Archaea* şi *Eucarya*. În pofida faptului că atât *Bacteria* cât şi *Archaea* sunt procariote la nivel molecular, din punct de vedere filogenetic sunt diferite (fig. 2.2).

Cele trei grupe de microorganisme s-au diversificat la începutul apariţiei vieţii pe pământ dintr-un strămoş comun, universal. Deoarece plantele şi animalele sunt eucariote, rezultă că microorganismele eucariote sunt strămoşii organismelor multicelulare, în timp ce *Bacteria* şi *Archaea* sunt ramuri care nu au depăşit faza de „stadiu microbian". Evoluţia iniţială de la stămoşul universal s-a desfăşurat în două direcţii şi anume: *Bacteria versus Archaea/Eucarya*. Mai târziu *Archaea* şi *Eucarya* s-au separat de la un alt strămoş comun în două direcţii de evoluţie. De aceea, *Archaea* şi *Eucarya* sunt mai înrudite filogenetic decât fiecare dintre acestea cu *Bacteria*. De remarcat faptul că ramificaţia *Archaea* începe în apropierea rădăcinii arborelui filogenetic, rămânând şi astăzi ramura primitivă (mai puţin evoluată), în timp ce *Eucarya* este ramura cea mai evoluată. Astfel, ramificaţia eucariotă a permis evoluţia unor caracteristici legate de creşterea dimensiunii celulare care, la rândul ei, a facilitat sinteza unei cantităţi mai mari de ADN şi acceptarea endosimbionţilor de tip procariot. Plasarea *Archaea* aproape de strămoşul universal este susţinută de faptul că reprezentanţii acesteia trăiesc în condiţii extreme de temperatură, *p*H, salinitate, condiţii de mediu înconjurător existente la începutul apariţiei vieţii pe pământ. De aceea, reprezentanţii *Archaea* pot fi consideraţi „relicvele" primelor forme de viaţă.

Caracteristicile de structură şi funcţiile celulelor procariote şi eucariote implicate în procesele biotehnologice sunt sintetizate în tabelul 2.1.

Tabelul 2.1

Caractere diferenţiale ale celulelor procariote şi eucariote

Proprietăţi	Procariote	Eucariote
1	2	3
Microorganisme	*Bacteria, Archaea*	*Eucarya* (alge, fungi, protozoare, plante, animale)
Structura şi funcţiile nucleului:		
– membrană nucleară	Absentă	Prezentă
– nucleol	Absent	Prezent
– ADN	Moleculă ADN dublu catenară, circulară închisă, necomplexată cu histone, ADN-plasmidial	Prezent sub formă de cromozomi complexaţi cu histone
– diviziune	Diviziune binară	Mitoză
– reproducere sexuată	Transfer parţial de material genetic: transformare, transducţie, sexducţie, transfecţie, conjugare fără fuziune celulară	Meioză (reasortarea întregului cromozom)
– introni în gene	Rari	Fenomen obişnuit

Tabelul 2.1 (continuare)

1	2	3
Citoplasma:		
– membrană citoplasmatică	Lipsesc sterolii	Sterolii prezenţi în mod obişnuit
– membrană internă	Simplă, limitată la grupuri specifice	Complexă, reticul endoplasmatic, aparat Golgi
– ribozomi	Mulţi ribozomi liberi 70S	Ribozomi liberi 80S
– respiraţia	Absente mitocondriile. Enzime localizate pe membrana citoplasmatică	Mitocondrii (organe specializate).
– pigmenţi fotosintetizanţi	Pe membrana internă sau clorozomi	Cloroplaste
– perete celular	Prezent, compus din peptidoglican, alte polizaharide, proteine, glicoproteine	Prezent la plante, alge, fungi, absent la animale – polizaharide
– endospori	Prezenţi, foarte rezistenţi la căldură	Absent
Mobilitate:		
– flageli	Prezenţi, mişcări rotative	Flageli sau cili compuşi din microtuburi. Nu se rotesc
– microtuburi	Absenţi	Prezenţi
– dimensiune	< 2 μm	2 – 100 μm

2.1.1. Bacteriile (*Schizomycetes*)

Bacteriile sunt procariote. Informaţia lor genetică nu este localizată în cromozomi, ci într-o moleculă de ADN dublu catenar circular închis. De aceea se poate spune că informaţia genetică este cuprinsă într-un singur cromozom. Bacteriile sunt lipsite de organele care sunt tipice pentru eucariote, ca de exemplu mitocondriile. Nu posedă reticulul endotelial.

Sunt în principal heterotrofe, se găsesc larg răspândite în natură şi sunt saprofite sau parazite.

Există reprezentanţi unicelulari mobili şi imobili sau multicelulari. În majoritatea cazurilor peretele lor celular este reprezentat de o structură mureinică, glico-proteină sau mucopeptidică.

Tipuri reprezentative de celule bacteriene. Marea lor varietate morfologică poate fi rezumată la câteva tipuri de bază:

Cocii sunt formaţiuni sferice cu diametrul transversal de 0,5–1 μ, care sunt clasificaţi după direcţia de diviziune şi dispunere în:

– *diplococi* – prezintă o direcție de diviziune, rezultând două celule care aderă una de alta: ∞ ;

– *streptococi* – prezintă, de asemenea, o singură direcție de diviziune cu mai multe celule dispuse în lanț: ∞∞∞ ;

– *tetracoci* – prezintă două direcții de diviziune, ceea ce duce la formarea unei tetrade: ⁘ ;

– *stafilococi* – prezintă trei direcții de diviziune care conduc la un aranjament neregulat al celulelor: ;

– *sarcina* – prezintă trei direcții de diviziune, cu aranjament în cub: .

Bacilii sunt formațiuni cilindrice cu extremități rotunjite sau drepte: ;

Vibrionii sunt celule sub formă de virgulă: .

Spirilii sunt celule care prezintă câteva curburi având extremitățile ascuțite (lungimea = 50μ): .

Spirilochetele sunt celule care prezintă multe curburi, fapt care le conferă flexibilitate (lungime 60μ): .

Corineformele sunt forme neregulate (reprezentant *Corynebacterium*).

În general, nu toate bacteriile pot fi încadrate în tipurile de bază prezentate, ca, de exemplu, micoplasmele care nu posedă perete celular, motiv pentru care variază ca formă și mărime, în aceeași categorie intrând și rickețiile (paraziți celulari). În plus, multe bacterii pot să-și schimbe forma prin schimbarea condițiilor externe (formele L) sau să prezinte forme de tranziție. Aceste schimbări sunt cunoscute sub denumirea de *pleomorfism*.

Formele vegetative ale bacteriilor mai pot fi clasificate ca: organisme unicelulare și multicelulare.

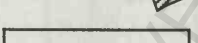
Organismele unicelulare pot fi sub următoarele forme: coci, bastonașe cu aspect polimorf; de asemenea, pot forma *asocieri celulare* (coenobia): aglomerare a unor indivizi independenți fiziologic care formează grupe ordonate sau neordonate, ca urmare a diviziunii celulare.

Organismele multicelulare sunt reprezentate de aglomerări de celule ce nu pot exista timp îndelungat independente fiziologic. În cazul procariotelor, aici sunt incluse formele producătoare de miceliu. Termenul de miceliu a fost preluat de la fungi, deoarece bacteriile formatoare de miceliu au fost incluse inițial printre acestea. Desigur, în cazul procariotelor nu putem vorbi de miceliu în adevăratul sens al cuvântului. Aceasta decurge și din faptul că în cadrul actinomicetelor există posibilitatea formelor de tranziție dintre agregatele de celule și organismele multicelulare, formatoare de miceliu. În acest caz, bacteriile se prezintă în forme filamentoase, care pot fi neramificate sau ramificate.

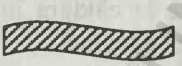
Dispunerea filamentelor poate fi:

– liberă și mobilă (*Beggiatoa*) : ;

– sub formă de panglici (*Thiotrix*): ;

– dreaptă (*Beggiatoa*):  ;

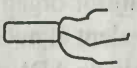
– lipită spiralat: ;

– formă gigant:  .

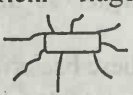
În cazul actinomicetelor se observă o evoluție de la forme predominant unicelulare, ca *Mycobacterium* cu diviziune binară, la *Nocardia* și *Actinomycetes*, cu miceliu fragmentat, și *Streptomyces* cu formațiuni conidiale.

Mobilitatea bacteriilor se realizează fie prin alunecare fie cu ajutorul flagelilor care pot fi aranjați diferit astfel:

– monopolar - monotrich, un singur flagel inserat la un pol („vibrio"): ;

– monopolar - politrich sau lofotrich, reprezentați de un mănunchi de flageli inserați la un pol (*Thiospirillum*):  ;

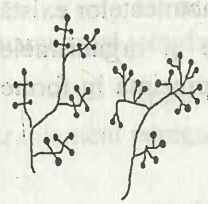
– dispunere bipolară (politrich sau amfitrichi) în mănunchi de flageli: ;

– peritrichi – flageli inserați fie pe părțile laterale ale celulei, fie pe toată suprafața celulei:  .

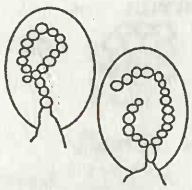
Multiplicarea bacteriilor. Are loc asexuat, prin transmiterea informației genetice fără recombinare. Multiplicarea asexuată se realizează prin fisiune binară.

Fisiunea binară are loc perpendicular pe axa longitudinală şi prin scindare (diviziune).

În cel de-al doilea caz, funcţie de natura exogenă sau endogenă a sporilor se deosebesc:



– *conidiospori*. Conidiile sunt unităţi de multiplicare vegetative exogene formate în mod obişnuit pe sporofori specifici, denumire incorectă după Zarnea care-i clasifică drept artrospori;



– *sporangiofori*, spori flagelaţi sau neflagelaţi, de origine endogenă în sporangiu;

Endosporii sunt forme rezistente la căldură înaltă, având peretele sporal format din multe straturi. Sunt de origine endogenă.

Multiplicarea prin recombinarea materialului genetic înlocuieşte multiplicarea sexuată şi se realizează prin:

– conjugare, care presupune asocierea celulelor şi transferul unidirecţional al materialului genetic printr-un tub proteic (exemplu factor F la *E. coli*);

– transformarea - încorporarea ADN-ului liber de către celula bacteriană;

– transducţie – transferul materialului genetic de la bacterie la bacterie cu ajutorul bacteriofagului ca vector.

Organizarea materialului genetic. Cromozomul bacterian este reprezentat de ADN dublu catenar, circular închis.

Expresia de *cromozom* este incorectă în *stricto senso*, această denumire fiind rezervată doar cromozomilor organizaţi diferenţial la eucariote. Se utilizează de asemenea termeni ca echivalent al nucleului şi nucleoid.

Plasmida este moleculă de ADN circulară, adiţională (lungimea 1–15μm).

Tipul de nutriţie la bacterii poate fi:

– autotrof, caz în care procurarea energiei se face fie cu ajutorul luminii (fotoautotrofie) fie al compuşilor anorganici (chemoautotrofie);

– heterotrof, caz în care procurarea energiei se face din compuşi organici.

După modul de procurare al energiei se deosebesc bacterii:

– aerobe, care necesită oxigen (respiraţie) ca acceptor de electron;

– anaerobe sau tipul fermentativ – procese în care reacţiile chimice producătoare de energie necesită prezenţa unor compuşi organici ca acceptori finali de electroni.

Tabelul 2. 2

Bacteriile importante în biotehnologie

Familia	Genuri implicate în biotehnologie	Grup – Familia	Genuri implicate în biotehnologie
Bacteriile aerobe Gram-negative *Pseudomonadaceae* *Methylmonadaceae* *Azotobacteriaceae*	*Pseudomonas*, asimilarea hidrocarburilor SCP (single cell protein) oxidarea steroizilor, oxidarea O_2 *Acetobacter,* oxidarea alcoolilor Etanol → acid acetic Sorbitol → sorboză *Methylomonas, Methylococcus*: oxidarea metanului şi metanolului *Azotobacter:* fixarea nesimbiotică a azotului	Bacterii formatoare de endospori. *Bacillaceae* *Bacterii nesporulate* Gram-pozitive *Lactobacillaceae*	*Bacillus:* producerea de antibiotice (de natură polipeptidică), enzime *Clostridium*: producerea de butanol, acetonă, acid butiric *Lactobacillus*: formarea de acid lactic şi produse lactate, silozuri, alimente pe bază de acid lactic, alimente degradate
Bacterii facultativ anaerobe Gram-negative *Enterobacteriaceae*	*Escherichia şi Aerobacter:* formarea nucleotidelor şi a acidului 2-ceto glutaric	*Actinomycetes* şi microorganisme înrudite, corineforme	*Corynebacterium şi Arthrobacter*: oxidarea glucidelor cu formarea aminoacizilor *Cellulomonas* – degradarea celulozei
Bacterii chemolitotrofe Gram-negative	*Thiobacillus:* flotare cupru, zinc, fier, mangan	*Propionibacteriaceae* *Mycobacteriaceae*	*Propionibacterium*: obţinerea vitaminei B_{12} şi acid propionic *Microbacterium*: oxidarea glucidelor, a steroizilor
Bacterii formatoare de metanol *Methanobacteriaceae* Coci Gram-pozitivi *Micrococaceae* *Streptococaceae*	*Methanobacterium, Methanosarcina, Methanococcus:* formarea de metan în turnurile de digestie, în tratamentul apelor reziduale *Micrococcus:* oxidarea glucidelor şi steroizilor *Streptococcus*: formarea acidului lactic şi diacetil *Leuconostoc* – formarea dextranului	*Nocardiaceae* *Streptomycetaceae*	*Nocardia* – oxidarea glucidelor şi steroizilor *Streptomyces* – formarea de diverse antibiotice şi a vitaminei B_{12}

Modul de viață al bacteriilor poate fi:

- saprofit, bacteriile folosind pentru nutriție material organic mort;
- parazit, nutriție din material organic viu;
- simbiont. În acest ultim caz transmiterea nutrienților se face în lanț, produsul final al unei specii fiind folosit ca nutrient de o altă specie ș.a.m.d.

Cu excepția actinomicetelor, toate bacteriile importante din punct de vedere biotehnologic (tabelul 2.2) aparțin ordinului *Eubacteriales*.

2.1.2. Drojdiile

Drojdiile și fungii fac parte din grupa mare a ciupercilor.

Caracterele și clasificarea drojdiilor. Drojdiile reprezintă o ramură minoră a ciupercilor sub raportul numărului de specii, dar de o importanță majoră în ceea ce privește activitatea biochimică. Unele dintre ele realizează fermentații cunoscute încă din antichitate, ca producerea vinului și a berii.

Drojdiile sunt eucariote saprofite, se găsesc răspândite pe fructe, pe nectarul florilor, libere în sol și în tubul digestiv al animalelor și insectelor.

Drojdiile nu formează un grup sistematic omogen, fiind răspândite în cele trei grupe majore ale ciupercilor superioare. Caracteristica lor generală se referă la forma unicelulară permanentă sau predominantă și la absența unui miceliu veritabil coenocitic.

Identificarea și clasificarea drojdiilor se face după următoarele criterii: forma și mărimea celulelor, modul de reproducere, formarea mugurilor și a pseudomiceliului, existența sporulării etc.

Drojdiile care se multiplică sexuat sunt sporogene. Formele ascosporogene incluse în *Ascomycetes* formează ascospori în asce. Balistosporogenele, incluse în *Basidiomycetes*, formează balistospori.

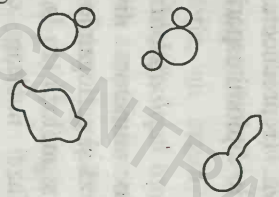
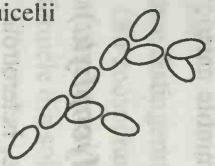
Drojdiile asporogene nu au reproducere sexuată și sunt incluse la Fungi imperfecți.

Principalele grupe de drojdii și caracteristicile lor sunt cuprinse în tabelul 2.3.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 2.3

Clasificarea drojdiilor

Structuri vegetative	Multiplicare asexuată	Genuri	Multiplicare sexuată
Celule vegetative izolate rotunde, ovoide sau alungite în hife rudimentare	Fisiune transversală Înmugurire 	*Hemiascomycetes* *Endomycetales* – *Schizosaccharomyces* – *Saccharomyces* – *Hansenula* – *alte genuri*	Asce conținând ascospori. Ascospori cu forme diferite: – sferice – reniforme – seceră – pălărie cu inel bazal sau ecuatorial
Celule izolate Pseudomicelii 	Înmugurire	*Sporobolomycetales* – *Sporobolomyces* – *Rhodosporidum* – *Leucosporidum*	Formarea sporilor în excrescențe celulare (sterigme). Eliberarea brutală a sporilor în aer. – balistospori (nu se observă fază sexuată) – basidiospori
Celule izolate Pseudomicelii	Înmugurire	*Torulopsidales* – *Trigonopsis* – *Candida* – *Torulopsis* – *Cryptococcus*	Nu formează ascospori sau balistospori

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ciclul de viață sexuat. În concordanță cu modul de multiplicare sexuat, ciclul de viață începe cu zigotul care se formează prin plasmogamie (fuziunea gameților – *P*), cariogamie (fuziunea nucleilor – *C*) și se încheie cu formarea de gameți (*G*) imediat după meioză (*M*) sau ceva mai târziu. Aceste faze nucleare alternative nu sunt direct legate unele de altele, putând fi alternate de diviziuni mitotice care în majoritatea cazurilor conduc la forme vegetative. Diferitele cicluri de viață sunt clasificate după cum mitozele au loc în faze haploide, diploide sau ambele faze.

• *Ciclul de viață haploid.* În ciclul de viață haploid forma vegetativă este haploidă, deoarece meioză apare imediat după cariogamie. Faza diploidă se limitează numai la zigot. Multiplicarea vegetativă este posibilă prin haplomitospori.

• *Ciclul de viață diploid.* În ciclul de viață diploid forma vegetativă e diploidă deoarece o serie de diviziuni mitotice au loc între cariogamie și meioză (M). Faza haploidă există numai la gameți. Forma vegetativă (reproducere asexuată) este posibilă numai prin diplomitospori.

• *Ciclul de viață haplodiploid.* În ciclul de viață haplodiploid au loc numeroase diviziuni mitotice și anume între meioză și cariogamie (ca la haploizi) și între cariogamie și meioză (ca la diploid). În acest caz alternarea fazei nucleare este legată de o alternare a generațiilor.

Ciclurile de viață amintite anterior sunt caracteristice atât pentru drojdii, cât și pentru fungi.

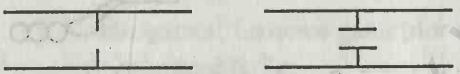
2.1.3. Fungii (*Mycophyta*)

Fungii sunt eucariote, heterotrofe, saprofite sau parazite prezente în apele dulci sau în sol. Saprofitele și unele parazite pot fi cultivate în condiții de laborator. Printre fungi se găsesc toate formele de tranziție de la organisme unicelulare mobile la multicelulare, dar cu tal coenocitic de structură complexă. Nu formează țesuturi adevărate. Cu excepția unor fungi care nu au perete celular, peretele lor

conţine chitină, iar un grup restrâns conţine celuloză. Celulele sunt de tip eucariot, conţin mai mulţi nuclei, nu conţin plasmide.

Forme vegetative. Formele vegetative se prezintă ca:

– plasmodiu, un tal ameboidal fără perete celular (*Myxomycetes*);

– hife, care au structură filamentoasă ramificată, fie neseptată (*Phycomycetes*), fie septată (*Ascomycetes, Basidiomycetes*). Septul este în general perforat anular sau doliporic:  ;

– miceliu, care reprezintă totalitatea hifelor;

– heterocarion, un miceliu conţinând nuclei diferiţi din punct de vedere genetic;

– dicarion, o formă specială de heterocarion, conţinând numai doi nuclei diferiţi / celulă, ceea ce le permit să se dividă prin conjugare;

– monocarion, o formă specială de homocarion, la care fiecare celulă conţine numai un nucleu;

– celule înmugurite sferice sau elipsoidale, rezultatul multiplicării vegetative. Mugurii se desprind de pe celula-mamă. În cazul înmuguririi miceliului, celulele-mugur-„fiice" formează o asociaţie de celule;

– plehtenchim, un ţesut „neadevărat". Coeziunea în „aşa-zisul" ţesut se realizează prin tumefierea celulelor cu formarea unui gel insolubil în apă, care cuprinde întreg sistemul hifal;

– scleroţia, un organ plehtenchimal multicelular, fiind o formă de supravieţuire (*resting*).

Forme de multiplicare. Transmiterea informaţiilor genetice fără recombinare. Ca forme de multiplicare deosebim:

– *holocarpul.* Întreaga celulă vegetativă este transformată într-un dispozitiv de multiplicare;

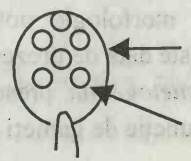
– *eucarpul.* O parte din tal (miceliu) formează dispozitivul de multiplicare, în timp ce restul celulelor îşi continuă activitatea vegetativă.

Formele auxiliare de multiplicare se folosesc pentru multiplicarea vegetativă; nu are loc alternarea fazelor nucleare.

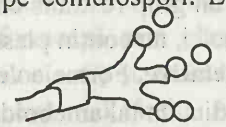
Ca forme auxiliare de multiplicare distingem:

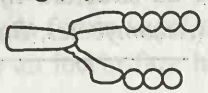
– *planosporii* sau *zoosporii.* Din zoosporangiu se formează unul sau doi flageli. Sunt caracteristici la fungii acvatici şi paraziţi.

– *aplanosporii*, care apar la formele din sol şi sunt:

– endospori, se formează în sporangiu; 

;

– exospori, care se formează pe conidiospori. Exosporii sunt mici, iar conidiosporii sunt tipici:  ;

– oidiospori. Sunt sferici sau alungiți și se formează prin desprindere (rupere) din hifele septate:  ;

– clamidiospori. Sunt spori în stare de latență. Sunt dispuși terminali sau în interiorul hifei, se formează din unul sau două sau mai multe septuri după contracția protoplasmei, de aceea între clamidiosporii individuali se pot observa hife cu citoplasmă:

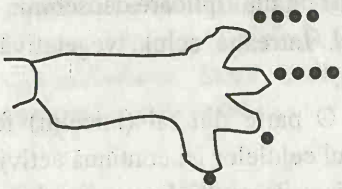
Forme principale de fructificare. Se folosesc pentru multiplicarea sexuată. Are loc alternarea fazelor nucleare.

La fungii imperfecți, organele de latență (sporii) apar din zigot, care, de obicei, germinează după meioză, pentru a forma sporangiu.

La fungii superiori, nu se formează, de regulă, spori. Nucleul zigotului se divide meiotic și se formează un meiosporangiu. Deosebim:

– asc – sporangiu sub formă de teacă, în care meiosporii, de obicei 8, sunt formațiuni libere. Caracteristici pentru *Ascomycetes*:

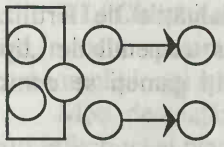
– basidii – sporangiu sub formă de măciucă, din care s-au segmentat prin meioză, de obicei, 4 meiospori:



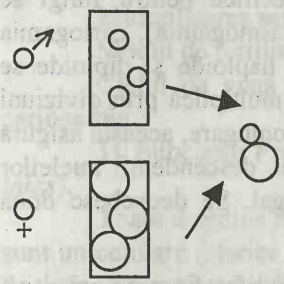
– hymenium – sporangiu răspândit pe suprafața miceliului și străbătut de hife sterile (parahife). Sporangiul se formează neregulat sub formă de *hymenium* sau organe de fructificare pleptenchimale (ascocarpi sau basidiocarpi).

Modul de fertilizare. Fertilizarea în sensul strict al cuvântului este o cariogamie. Are loc după fuziunea (plasmogamia) elementelor de multiplicare, care sub aspect morfologic pot diferi considerabil. Marea varietate a modului de fertilizare este dată de prezentarea lor în continuare.

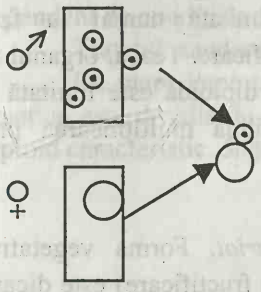
Gametogamia presupune fuziunea gameților individuali formați în sporangiu. În funcție de gameți deosebim:



– izogamia: fuziunea gameților de aceiași formă și mărime;

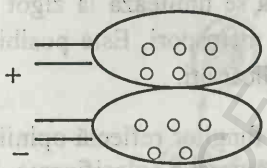


– anizogamia: fuziunea gameților de aceiași formă, dar de mărimi diferite;



– oogamia: fuziunea gameților de formă și mărime diferită.

Gametangiogamia presupune fuziunea gametangiilor (organ purtător de gameți). Prin analogie cu gametogamia distingem:

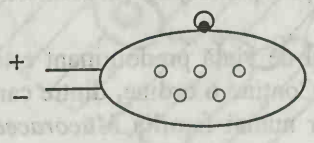


– izogametangiogamia;

– anizogametangiogamia;

– oogametangiogamia.

Gametogametangiogamie este fuziunea dintre gamet și gametangiu:

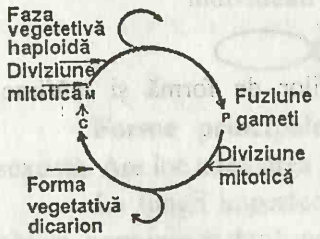


Somatogamia este fuziunea dintre celulele vegetative nediferențiate, dar + și – .

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Deoarece există limitări în ceea ce privește modalitățile de fertilizare, așa-numitele incompatibilități de împerechere, s-a introdus termenul de „tip de împerechere", înțelegându-se prin aceasta că numai anumiți gameți se combină între ei. Gameții au fost notați cu simbolul + și – sau *a* și α.

Ciclul de viață sexuat. Ciclurile de viață specifice pentru fungi se caracterizează prin aceea că, după fuziunea gameților (plasmogamia), cariogamia (fuziunea nucleilor) nu are loc imediat, iar între fazele haploide și diploide se inserează o așa-numită fază dicariotică în care nucleii se multiplică prin diviziuni mitotice. Deoarece aceste diviziuni nucleare au formă de conjugare, aceasta asigură faptul că, la sfârșitul fazei dicariotice a formării zigotului, descendenții nucleilor celor doi gameți sunt prezenți în număr aproximativ egal. Se deosebesc două cicluri.



• *Ciclul de viață haplodicariot.* Forma vegetativă a haplodicariofazei este limitată numai la faza timpurie a organelor de fructificare. Teaca, organul de fructificare e haploidă. Faza diploidă este limitată la nucleul zigotului. Este posibilă multiplicarea prin haplomitospori.

• *Ciclul de viață dicariot.* Forma vegetativă (incluzând teaca organelor de fructificare) este dicariotică, deoarece imediat după formarea haplomeiosporilor aceștia sau celulele rezultate sunt supuse fuziunii (somatogamia). Faza diploidă se limitează la zigot și faza haploidă, în general, la meiospori. Este posibilă multiplicarea prin mitospori dicarioți.

Clasificarea fungilor. Clasificarea taxonomică a fungilor reflectă opiniile subiective ale sistematicienilor. Din punct de vedere pragmatic, clasificarea în 4 clase principale și ordine reflectă cel mai bine distribuirea reprezentanților importanți biotehnologic.

I. *Clasa Myxomycetes* – nu prezintă interes în biotehnologie.

II. *Clasa Phycomycetes.* Sunt microorganisme unicelulare, cu miceliul organizat macroscopic, cu pereți transversali evidenți numai în timpul multiplicării.

Multiplicare asexuată se face prin planospori (la formele acvatice) sau prin aplanospori (la formele din sol).

Multiplicarea sexuată – ciclul de viață predominant este haploid, dar, de asemenea, și diploid și haplodiploid. Conține 6 ordine, dintre care ultimul, ordinul *Zygomycetales*, conține 3 familii, dar numai familia *Mucoraceae* (30 de genuri) este importantă din punct de vedere tehnologic.

Rhizopus nigricans este fungul folosit din cele mai vechi timpuri pentru producția biotehnologică a acidului citric.

III. *Clasa Ascomycetes.* Fungii din această clasă sunt purtători de asci, având miceliu puternic ramificat, cu pereţi transversali perforaţi care permit trecerea nucleilor şi a altor organe.

Mod de viaţă: saprofit, conţinând multe specii coprofite sau paraziţi şi agenţi infecţioşi ai plantelor.

Multiplicarea sexuată prin ascospori.

Modul de fertilizare: gametogamie sau gametogametangiogamie.

Ciclul de viaţă – faza dicariotică are loc adesea între faza haploidă şi cariogamie.

1) Subclasa: *Protoascomycetidae*, ordinul *Endomycetales* (*Saccharomycetales*).

Toate drojdiile aparţin acestui taxon. Deşi în majoritatea cazurilor drojdiile sunt unicelulare (sferice sau elipsoidale), celulele pot agrega în forme producătoare de hife. Formarea hifelor reprezintă un caracter de specie, dar este tranzitoriu, dependent de condiţiile de mediu.

Tratatul standard pentru taxonomie este Lodder.

De mare importanţă atât în cercetarea fundamentală cât şi pentru scopuri practice este drojdia de panificaţie sau bere – *Saccharomyces cerevisiae*. Este un diploid caracteristic. *Schizosaccharomyces* pombe este tipic haploid (fig. 2.3)

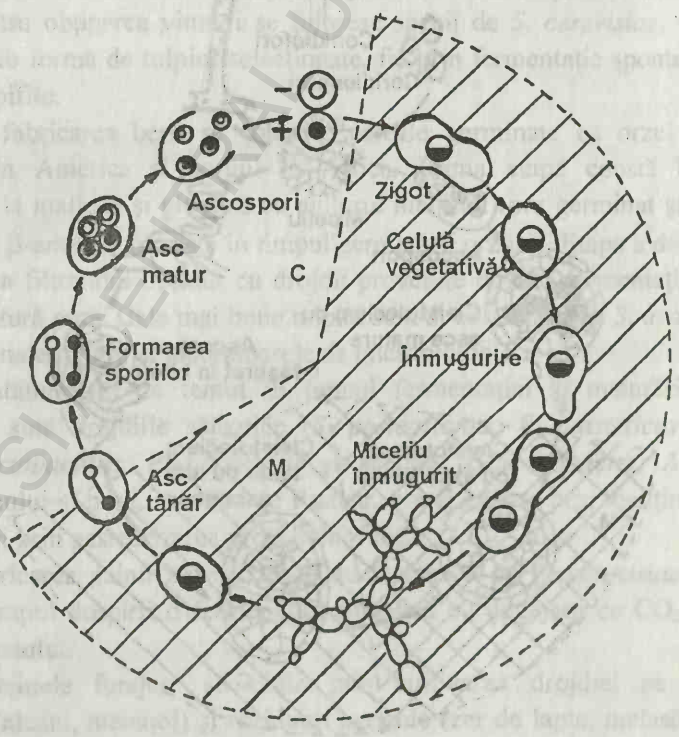
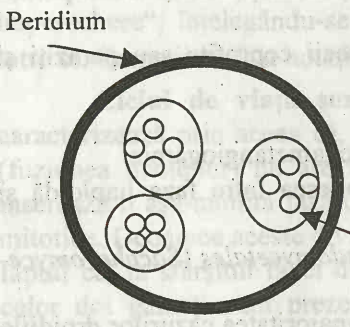


Fig. 2.3. Ciclul de viaţă la *Sacharomyces cerevisiae.*

2) Subclasa: *Plectomycetides.*



Cleistotecium – organ de fructificare închis într-un corp sferic: sporii sunt eliberați numai după spargerea peretelui corpului (peridium).

În ordinul *Plectascales* intră microorganismele clasice pentru industria fermentativă şi anume: reprezentanți din gen. *Penicillium, Aspergillus* şi *Cephalosporium*, care sunt în prezent în atenția cercetătorilor şi biotehnologilor.

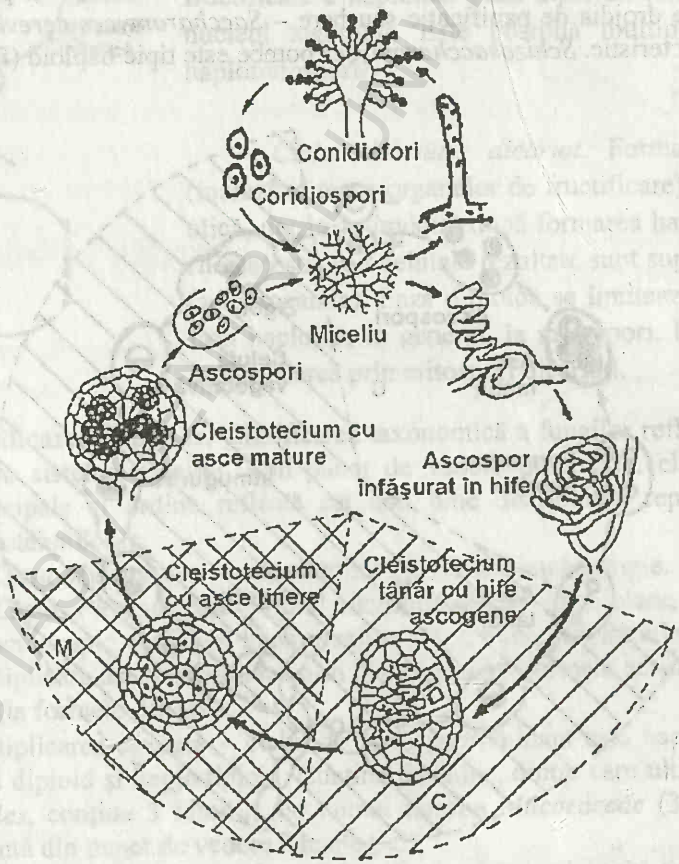


Fig. 2.4. Ciclul de viață la *Aspergillus repens.*

Majoritatea speciilor celor trei genuri sunt fungi imperfecţi, dar sunt plasaţi la fungi perfecţi datorită conidioforilor tipici. *Aspergillus repens* serveşte ca formă de referinţă (fig. 2.4).

IV. *Clasa Basidiomycetes* nu conţine forme importante pentru biotehnologie.

Clasa fungi imperfecţi (*Deuteromyces*) şi-au pierdut capacitatea de reproducere sexuată. În acest taxon intră fungi importanţi pentru biotehnologie, ca tulpini din genul *Aspergillus, Penicillium* şi *Cephalosporium*, care pot fi trecuţi şi la fungi perfecţi (cum s-a făcut de altfel) pe baza unor caracteristici morfologice.

2.1.4. Rolul şi utilizarea microorganismelor în biotehnologii

Din timpuri imemoriale omul a folosit microorganismele pentru prepararea băuturilor, alimentelor şi îmbrăcămintei, deşi existenţa acestora nu a fost recunoscută şi studiată decât începând cu secolul al XIX-lea.

Drojdiile. *Saccharomyces cerevisiae* este specia principală folosită de om pentru producerea alcoolului etilic şi a dioxidului de carbon prin fermentaţie.

Pentru obţinerea vinului se folosesc specii de *S. cerevisiae*, var. *ellipsoideus*, fie sub formă de tulpini selecţionate, fie prin fermentaţie spontană realizată cu drojdii epifite.

La fabricarea berii se folosesc cereale germinate ca orzul în Europa, porumbul în America şi sorgul în Africa. Prima etapă constă în hidroliza amidonului la maltoză şi glucoză cu ajutorul malţului (orz germinat şi uscat) care conţine α şi β-amilaze formate în timpul germinării orzului. Etapa a doua constă în însămânţarea filtratului obţinut cu drojdii provenite dintr-o fermentaţie anterioară sau cu o cultură pură. Cele mai bune tulpini sunt *S. cereivisiae* şi *S. uvarum* care au fost selecţionate treptat în laboratoarele de microbiologie.

Contaminanţii de temut în timpul fermentaţiei şi maturării sau după îmbuteliere sunt drojdiile sălbatice (*S. pasteurianus, S. diastaticus*), bacteriile lactice (*Lactobacillus, Pediococcus)* şi acetice (*Gluconobacter, Acetobacter*). „Bolile" vinului şi berii, studiate de Pasteur, pot fi evitate prin menţinerea igienei industriale şi prin pasteurizarea produsului finit.

Fabricarea pâinii se realizează de asemenea cu *S. cerevisiae*, care efectuează în timpul dospirii o fermentaţie alcoolică cu degajare de CO_2 ce permite afânarea aluatului.

Proteinele furajere se obţin prin cultivarea drojdiei pe subproduse industriale (alcani, metanol) şi reziduuri agricole (zer de lapte, melasă). Adăugate în furajele animalelor, proteinele aduc un bun aport de aminoacizi, vitamine şi acizi nucleici.

Fungii. Ca şi drojdiile, fungii sunt folosiţi de om pentru prepararea alimentelor şi a medicamentelor. Descoperirea antibioticelor şi, în particular, a penicilinei a revoluţionat, după cel de-al doilea război mondial, terapeutica medicală permiţând combaterea unor infecţii redutabile, salvând astfel milioane de vieţi omeneşti.

Fungii sunt folosiţi în fabricarea produselor alimentare ca de exemplu:

În industria brânzeturilor au un rol primordial în înmuierea şi aromatizarea pastei, folosindu-se tulpinile: *Penicillium roquefortii* (brânză cu pastă verde), *Penicillium camembertii* şi *Geotrichium candidum* (pastă presată).

În industria salamurilor folosirea unui strat alb de *Penicillium nalgiovense* pe suprafaţa salamurilor previne dezvoltarea microorganismelor care degradează produsul.

În Extremul-Orient băuturile alcoolice de tip sake japonez sunt fabricate cu ajutorul fungilor. Hidroliza amidonului din orez care precede fermentaţia se realizează cu amilaze biosintetizate de *Aspergillus oryzae*.

Industria chimică şi farmaceutică produce prin biosinteză:

– enzime: proteaze, pectinaze, amilaze cu tulpini din genul *Aspergillus;*

– acizi organici: acid citric cu *Aspergillus niger*;

– antibiotice: penicilina cu tulpina *Penicillium chrysogenum*, cefalosporinele cu tulpini din genul *Cephalosporium;*

– hormoni-cortizoni;

– biomasă în scopul obţinerii unei surse complementare de proteine pentru furajarea animalelor. Pentru aceasta se folosesc subproduse ale industriei alimentare şi reziduuri agricole: zer, melasa de la fabricarea zahărului din sfeclă de zahăr, drojdia de la distilării, paiele etc.;

– multe specii saprofite, care se dezvoltă pe resturile organice animale şi vegetale desăvârşind astfel marele ciclu biologic natural.

Bacteriile. ***Bacteriile acetice*** (*Gluconobacter, Acetobacter*) sunt folosite la fabricarea tradiţională a oţetului din vin, cidru, cartofi. Ele sunt strict aerobe. Oxidează, de asemenea, sorbitolul în sorboză, care e utilizată apoi în sinteza viteminei C.

Bacteriile lactice (*Lactobacillus, Lactocccus, Streptococcus*) fermentează produsele lactate (iaurt, brânză dulce). Bacteriile lactice sunt prezente în mod obişnuit în lapte, transformând lactoza în acid lactic, acidifiind laptele, provocând astfel o acrire spontană. La folosirea brânzeturilor ele participă atât la formarea cheagului, cât şi la maturarea lui.

La fabricarea untului din smântână, *Lactococcus diacetylactis* produce diacetil care conferă gust şi aromă specifice untului.

Fermentația lactică a produselor vegetale conservă și îmbunătățește calitățile nutritive ale furajelor însilozate și a murăturilor folosite în gospodăriile individuale.

Acidul lactic este produs pe scară industrială fiind folosit în scopuri farmaceutice.

Bacteriile butirice (*Clostridium butyricum*). Sunt bacterii sporulate, strict anaerobe, aparținând genului *Clostridium*. Intervin în înmuierea inului și a cânepii. Prin atacarea pectinelor eliberează fibrele textile.

Producerea industrială a acetonei și butanolului se realizează cu *Clostridium acetobutylicum* prin fermentarea unor glucide.

Genul *Bacillus* reprezintă un grup de microorganisme Gram-pozitive sporulate, aerobe.

Unii reprezentanți ai genului ca *Bacillus thuringiensis* produc substanțe toxice. Bacilii produc în timpul sporulării o proteină care formează o incluziune cristalină vizibilă la microscop. Această proteină este toxică pentru larve. Bacillii cultivați în bioreactoare sunt recoltați după începutul sporulării, sunt uscați și încorporați într-o pudră de protecție pentru arbori fructiferi.

Unii reprezentanți ai genului *Bacillus* sunt utilizați pentru producerea enzimelor ca:

– proteaze termostabile pentru industria detergenților (*B. thermoprotheolyticus*);

– α-amilaze, care convertesc amidonul în glucoză (*B. stearothermophilus*);

– glucozizomeraza, care permite conversia glucozei (amidonul de porumb) în fructoză cu putere edulcorantă mai puternică, folosită în industria băuturilor nealcoolice (*B. coagulans*).

Actinomicetele produc substanțe antibiotice folosite în combaterea maladiilor infecțioase. Speciile producătoare de antibiotice aparțin mai ales genului *Streptomyces.*

Bacteriile din genul *Corynebacterium și Brevibacterium* și mutantele derivate din aceste microorganisme produc aminoacizi: acid L-glutamic, L-lizina și L-triptofan.

Bacteriile metilotrofe cultivate pe metan sau metanol constituie o sursă de proteine pentru zootehnie.

Propionibacterium se utilizează la producerea de vitamină B_{12}.

Bacteriile termofile metanogene sunt utilizate pentru digestia anaerobă a efluenților industriali, a unor reziduuri agricole și menajere în stațiile de epurare.

2.1.5. Microorganismele extremofile şi aplicaţiile lor în biotehnologii

În ultimii ani s-a consolidat ideea că viitorul biotehnologiilor depinde nu numai de îmbunătăţirea produselor şi a proceselor cunoscute, de utilizarea unor alternative ale acestora sau de proiectarea unor bioreactoare mai performante, ci mai ales de introducerea şi descoperirea unor organisme noi, de activităţi şi noi fenomene exploatabile [Bull, 1992].

Necesitatea crucială de progres şi inovaţie în biotehnologiile microbiene are la bază biodiversitatea microorganismelor şi implică investigarea unui număr cât mai mare de medii naturale, şi, mai ales, a unor habitate diverse de tipul mediilor extreme, care sunt o sursă bogată de microorganisme încă necunoscute sau insuficient studiate. Microorganismele respective sunt numite *extremofile* şi constitue un potenţial valoros de genomuri şi biomolecule (enzime, antibiotice, biosurfactanţi, acizi graşi, compuşi osmoreglatori etc.), pentru cercetarea fundamentală, dar şi pentru biotehnologia aplicativă.

Din acest motiv Uniunea Europeană a recunoscut studiul extremofililor ca fiind o prioritate în cadrul proiectelor ştiinţifice de biotehnologie şi a finanţat, începând cu anul 1982, un program în domeniu, numit *Biotechnology of Extremophiles*. În cadrul acestui program, ajuns în prezent la al 5-lea proiect-cadru *Extremophiles as cell factories* (1999–2002), au fost realizate cercetări multidisciplinare îndreptate spre trei mari direcţii: izolare/taxonomie, maşinărie celulară (studii de fiziologie, biochimie, structuri biologice) şi constituenţi genetici (studii de genetică moleculară şi inginerie genetică).

Un număr relativ mare de microorganisme care cresc în biotopuri extreme cum sunt lacurile hipersaline şi alcaline, izvoarele geotermale şi sistemele marine hidrotermale şi care prezintă proprietăţi unice au fost izolate, identificate şi caracterizate. Aceste organisme, care aparţin în cea mai mare parte procariotelor (Archaea şi Bacteria), dar şi eucariotelor (fungi, alge flagelate fotosintetice – *Dunaliella* şi *Asteromonas*, diatomee – *Nitzschia* şi *Navicula*) au fost clasificate în mai multe categorii:

– microorganisme adaptate supravieţuirii la concentraţii extreme de temperatură (*psichrofile* sau *criofile* şi *termofile*);

– microorganisme adaptate creşterii la concentraţii extreme de *p*H (*acidofile* şi *alcalifile*);

– microorganisme care supravieţuiesc în condiţii de presiune hidrostatică ridicată (*barofile*);

– microorganisme care se dezvoltă în medii cu activitatea apei (W_a) redusă (*osmofile*, *halofile*, *xerotolerante*).

Majoritatea extremofililor studiaţi au fost izolaţi din biotopuri naturale extreme, zone rar întâlnite pe pământ deoarece sunt rezultatul unor combinaţii neobişnuite între factorii geologici, geografici şi condiţiile climatice (izvoare geotermale, habitate reci din zona Antartica, medii acvatice alcalino-saline şi hipersaline, depozite de sare, soluri acide etc.). Pe lângă acestea au fost identificate şi o serie de habitate naturale neobişnuite, spre exemplu: frunzele plantei de deşert *Atriplex halinus* sau cavitatea nazală a iguanei de deşert de unde au fost izolate mai multe specii microbiene halofile, suprafaţa şi intestinele unor peşti marini în cazul bacteriilor criofile. Spectrul de microorganisme ce supravieţuiesc în astfel de biotopuri este influenţat de diverşi factori: temperatură, *p*H, salinitate, solubilitatea O_2, compoziţia ionică a mediului etc.

Investigaţiile ecologice efectuate în ultimii ani au condus la descoperirea extremofililor şi în diverse habitate poluate datorită activităţii umane (solurile alcaline de lângă fabricile de ciment, apele reziduale). Reziduurile industriale, spre exemplu apele uzate rezultate din industria alimentară, din prelucrarea pieilor de animale sau de la fabricarea hârtiei, caracterizate printr-o abundenţă de substraturile organice, săruri şi *p*H alcalin oferă condiţii optime de dezvoltare şi înmulţire microorganismelor alcalifile şi halofile.

Metodele de izolare şi selecţie a microorganismelor extremofile sunt foarte variate şi se bazează pe proprietăţile fiziologice ale acestora şi pe caracteristicile habitatelor din care au fost izolate. Izolarea tulpinilor bacteriene alcalifile, de exemplu, trebuie să se realizeze în medii alcaline ce conţin carbonat de sodiu, bicarbonat de sodiu, carbonat de potasiu sau uneori borat de sodiu. Aceste substanţe se folosesc în concentraţii de 0,5–2 %, astfel încât să asigure un *p*H cuprins între 8,5–11 şi necesarul de ioni de sodiu pentru creşterea, germinarea şi sporularea bacteriilor alcalifile.

Pe baza cercetărilor de optimizare a mediilor de creştere au fost stabiliţi parametri de realizare a procesului de fermentaţie la unele specii extremofile: termofilul *Pyrococcus furiosus,* halofilul *Marinococcus* M 52 producător de ectoină şi hidroxiectoină, termo-acidofilul *Sulfolobus shibatae* DSM 5389 producător de enzime. Dar, cu toate succesele înregistrate în ultima perioadă în ce priveşte strategiile de fermentare la extremofili se consideră că mai sunt necesare încă multe studii asupra optimizării mediilor de creştere şi a parametrilor fizico-chimici care să asigure randamente superioare de obţinere a produselor sintetizate de extremofili.

Principalele criterii care stimulează şi favorizează utilizarea microorganismelor extremofile în biotehnologii sunt:

- cultivarea în laborator este uşor de realizat;
- riscul de contaminare microbiană este foarte redus;
- sunt implicate în sinteza unor compuşi biologici cu proprietăţi unice;
- prezintă mecanisme specifice de adaptare genetică la condiţii extreme.

Aplicațiile microorganismelor extremofile sunt foarte variate (tabelul 2.4), acestea fiind utilizate în:

– industria de sinteză: producerea de enzime, antibiotice (tulpinile halofile produc o nouă clasă de bacteriocine numite halocine), compuși osmoreglatori, acizi organici, surfactanți etc.;

– biodegradare și epurarea apelor reziduale și a zonelor poluate;

– recuperarea reziduurilor petroliere;

– detectarea cancerului – o proteină de 84 kDa sintetizată de *Halobacterium halobium* este folosită ca antigen pentru detectarea anticorpilor împotriva oncogenei umane *c-myc* produsă în serul pacienților cu cancer;

– agricultură și ameliorarea plantelor prin inginerie genetică.

Speciile microbiene extremofile produc numeroase și variate tipuri de enzime, numite *extremozime*: proteaze de tipul subtilizinei sau elastazei, enzime care degradează amidonul (amilaze, CGT-aze, α-glucozidaze), lipaze, xilanaze, celulaze, pectinaze, catalaze, fosfataze, β-1,3-glucanaze, β-lactamaze, pulullanaza, enzime pentru cercetările de inginerie genetică (nucleaze, ADN-polimeraze, ligaze) etc. Spre exemplu, până în prezent au fost descoperite peste 35 de tipuri noi de enzime sintetizate de microorganismele alcalifile, proteine care sunt active la *p*H alcalin și sunt mai stabile decât enzimele alcaline produse cu tulpinile microbiene neutrofile.

Tabelul 2.4

Principalele aplicațiile ale microorganismelor extremofile în biotehnologii

Microorganisme	Enzime, compuși endogeni	Aplicații
1	2	3
Termofile (50–100°C)	Amilaze	Industria detergenților, alimentară, prepararea siropului de amidon, dextroză
	Xilanaze	Fabricarea hârtiei
	Proteaze	Industria detergenților, alimentară, panificație, prepararea berii
	DNA-polimeraze	Inginerie genetică
Psichrofile sau criofile (5–20°C)	Proteaze	Industria laptelui (maturarea brânzeturilor), fabricarea detergenților
	Amilaze	Panificație, prepararea berii, industria de detergenți, textilă
	Lipaze	Industria aromelor, aditiv la fabricarea detergenților
	Celulaze	Fabricarea hârtiei
	Beta-galactozidază	Industria laptelui
	Acizi grași polinesaturați	Industria farmaceutică
	Ice-protein	Obținerea de zăpadă artificială

BCU IAȘI CENTRU UNIVERSITAR

Tabelul 2.4 (continuare)

1	2	3
Acidofile pH<2	Oxidarea sulfului	Instalații industriale pentru solubilizarea metalelor neferoase din zăcămintele sărace în minereu, desulfurizarea cărbunilor, decontaminarea reziduurilor industriale
Alcalifile pH>9	Enzime amilolitice (amilaze, CGT-aza, amiloglucozidaza, pululanaza, izoamilaza)	Industria amidonului, alimentară, farmaceutică și cosmetică, fabricarea detergenților,
	Proteaze	Industria pielăriei, detergenților
	Lipaze	Industria detergenților
	Celulaze	Industria detergenților, epurarea apelor reziduale rezultate la fabricarea hârtiei
	Pectinaze	Biodegradare și epurarea apelor reziduale rezultate din prelucrarea citricelor
	Ciclodextrine	Stabilizarea substanțelor volatile
	Siderofori	Recuperarea Ga rezultat la prelucrarea bauxitei
Halofile 3-20% NaCl	Endonucleaze	Ingineria genetică
	Antibiotice (halocine)	Industria farmaceutică
	Compuși osmoreglatori	Industria farmaceutică, cosmetică, biodegradare
	Bioplastice	Industria farmaceutică, medicină
	Lipozomi	Industria cosmetică
	Caroten	Industria alimentară

2.2. TAXONOMIA ȘI NOMENCLATURA

Prin taxonomie se înțelege știința clasificării și cuprinde două discipline majore: identificarea și nomenclatura. Trebuie subliniată diferența dintre taxonomia bacteriană și filogenia bacteriană. Taxonomia bacteriană se bazează pe analize fenotipice convenționale de clasificare. Deoarece bacteriile sunt forme de viață mici și prezintă relativ puține structuri cheie referitoare la rădăcinile lor, relațiile filogenetice ale procariotelor pot fi induse doar din analize genotipice. Analizele fenotipice joacă un rol tradițional important în identificarea și clasificarea bacteriilor, în special când acestea au drept scop final diagnosticul

microbiologic clinic. Chiar şi în domeniul diagnosticului microbiologic în care metodele microbiologice convenţionale se folosesc de mai multe decenii, au început să fie aplicate metodele genotipice datorită sensibilităţii, rapidităţii şi specificităţii acestor metode de identificare.

Recent s-a introdus conceptul de taxonomie polifazică, care reuneşte integrativ şi unitar informaţii fenotipice, genotipice şi filogenetice.

Taxonomia cuprinde:

– clasificarea microorganismelor ce presupune aranjarea ordonată în grupe taxonomice pe baza similitudinii;

– nomenclatura, care presupune atribuirea de nume unităţilor taxonomice;

– identificarea de organisme necunoscute, în scopul ordonării în grupe taxonomice şi atribuirea de nume.

2.2.1. Clasificarea şi conceptul de specie

Deoarece microbiologii trebuie să identifice şi să clasifice bacteriile în scopuri practice, taxonomia rămâne în continuare o disciplină importantă. În microbiologie unitatea taxonomică de bază este specia.

Specia microbiană este o concepţie taxonomică şi nu o entitate definită cu precizie.

La microorganisme nu există specii adevărate (ca la plante şi animale cu reproducere biparentală) unde fenomenele de sexualitate joacă un rol fundamental, ci numai o reproducere clonală. Din această cauză la microorganisme există clone, ale căror proprietăţi globale rămân constante atât timp cât condiţiile de cultivare nu variază şi sunt cunoscute în laborator sub denumirea de „tulpini microbiene".

Clona reprezintă o populaţie de celule identice din punct de vedere genetic derivate dintr-o singură celulă.

Codul de nomenclatură a Comitetului Internaţional de Nomenclatură a fixat următoarele reguli:

– fiecare fel distinct de bacterie este numit specie;

– fiecare specie distinctă primeşte după regulile stabilite de Linne' un nume format din două cuvinte latineşti. Exemplu: *Bacillus subtilis*;

– primul cuvânt este numele genului şi este totdeauna un cuvânt latin sau grec latinizat, fiind scris totdeauna cu literă mare;

– al doilea cuvânt este un epitet specific, care nu este scris niciodată cu majusculă.

Genul este un grup constituit din specii înrudite.

Familia cuprinde un grup de genuri înrudite. Numele unei familii este format din numele unuia din genurile pe care le cuprinde, la care se adaugă sufixul „aceae". Exemplu: genul *Bacillus*, familia *Bacilaceae.*

Ordinul reprezintă un grup de familii înrudite. Numele unui ordin este format prin înlocuirea sufixului „aceae", al unei familii componente cu sufixul „ales". Exemplu: *Bacillales.*

Clasa este un grup de ordine înrudite.

Bacteriile fac parte din clasa *Schizomycetes* care cuprinde 10 ordine. Trebuie subliniat faptul că, datorită studiilor recente şi permanente referitoare la taxonomia microbiană, apar constant modificări în ceea ce priveşte încadrarea taxonomică a microorganismelor deja cunoscute.

2.2.2. Taxonomia bacteriană convenţională

Caracteristicile cu valoare taxonomică includ: morfologia, coloraţia Gram, tipul de nutriţie (fototrof, chemoorganotrof, chemolitotrof), compoziţia peretelui celular, prezenţa incluziunilor celulare şi a produşilor de rezervă, capsula, pigmenţii, necesităţi nutriţionale, folosirea sursei de carbon, azot şi sulf, produşii de fermentaţie, temperatura şi *p*H-ul (toleranţa), sensibilitatea la antibiotice, patogenitatea, relaţii simbiotice, caracteristici simbiotice, caracteristici imunologice şi habitat.

Coloraţia Gram reprezintă o caracteristică diferenţială utilă. În taxonomia convenţională, bacteriile sunt grupate ca bacterii Gram-pozitive, coci Gram-negativi, bacterii Gram-negative ş.a.m.d. Coloraţia Gram pare a fi o proprietate de importanţă fundamentală atât pentru clasificarea filogenetică a bacteriilor cât şi pentru taxonomie şi reprezintă primul test folosit pentru clasificarea noilor izolate. De asemenea, morfologia şi structurile speciale ale celulelor, ca de exemplu sporii, sunt folosite drept criterii de clasificare. De exemplu, endosporii bacterieni reprezintă o structură caracteristică unică şi de o importanţă practică deosebită, motiv pentru care toate bacteriile formatoare de endospori sunt clasificate atât taxonomic cât şi filogenetic în aceeaşi grupă.

Este cunoscut faptul că morfologia celulară nu reprezintă un criteriu de bază pentru relaţiile filogenetice şi trebuie folosit cu precauţie doar ca indicator general privind încadrarea taxonomică sau filogenetică.

2.2.3. Chemotaxonomia

În chemotaxonomie se folosesc diverse specii moleculare cu valoare taxonomică ca: proteine, enzime, peptidoglicani, membrană citoplasmatică şi produşi de metabolism.

Analiza proteinelor. Proteinele sunt molecule înalt conservate în timpul evoluției, în special cele necesare pentru fiziologia bacteriană : enzime, feredoxine, citocromi. Citocromii sunt hemoproteine transportoare de electroni. Sunt clasificați în patru clase, în funcție de natura grupărilor prostetice.

Pentru studiul acestora se folosesc două tehnici: dozare sptectrofotometrică pentru citocrom, iar pentru secvențele primare (aminoacizi) sau terțiare, difracția cu raze X. Această tehnică s-a folosit pentru evidențierea similarității dintre unele bacterii fotosintetizante (*Rhodopseudomonas capsulatus*), bacteriile nesulfuroase aerobe (*Paracoccus denitrificans*) şi mitocondria de la organismele eucariote. Studiile efectuate ar putea conduce la concluzia că *P. denitrificans* derivă din *R.. capsulatus* prin pierderea capacității de fotosinteză şi că aceste bacterii sunt înrudite cu endosimbionții care stau la baza mitocondriilor.

Profil electroforetic. Se cunoaşte faptul că datorită încărcăturii electrice proteinele pot migra când sunt puse într-un câmp electric. Metoda folosită în mod obişnuit în taxonomia microbiană constă în fixarea extractelor proteice pe geluri de poliacrilamidă. În acest scop celula va fi ruptă prin sonicare, având loc concomitent dislocarea subunităților polipeptidice libere cu ajutorul SDS. În continuare, amestecul de proteine este denaturat prin încălzire la 100°C cu un exces de SDS şi 2-mercaptoetanol care rupe legăturile protein disulfidice. În aceste condiții, polipeptidele leagă o cantitate constantă de SDS – aproximativ 1,4 g SDS/g de polipeptidă. Încărcătura polipeptidei devine nesemnificativă, comparativ cu încărcătura negativă purtată de SDS. Migrarea în gelul de poliacrilamidă depinde doar de mărimea polipeptidelor. Tehnica permite atât analiza compoziției amestecului polipeptidic, cât şi determinarea masei moleculare a acestora comparativ cu markerii de masă moleculară cunoscută.

S-a demonstrat experimental că există o reacție lineară între $\log_{10}$ a masei moleculare a peptidei şi mobilitatea ei relativă (R_f)care este apreciată prin distanța de migrare în gel. Studii comparative au arătat că rezultatele sunt în concordanță cu cele obținute prin hibridarea ADN/ADN.

Enzimele. În locul studierii tuturor proteinelor celulare, este posibil studiul unor enzime (zimograma). Activitatea enzimatică este evidențiată prin colorare în prezența unui substrat specific. Se aplică pentru evidențierea esterazelor şi dehidrogenazelor. Se obțin aproximativ aceleaşi rezultate ca prin hibridare ADN/ADN. Tehnica a fost propusă pentru identificarea bacteriilor.

Peptidoglicanii. Peptidoglicanul (mureina) este prezent la toate bacteriile, cu excepția micoplasmelor şi archeobacteriilor. Este compus dintr-un schelet aminoglucidic la care se leagă un lanț tetrapeptidic cu un diaminoacid în poziția *3*. Aceste lanțuri sunt legate direct sau printr-o punte la unul sau şase aminoacizi.

Scheletul aminoglucidic este constant, dar compoziţia lanţurilor tetrapeptidice şi a punţii este variabilă, în special la bacteriile Gram-pozitive incluzând actinomicetele şi lactobacilii. Peptidoglicanul este folosit în studiile taxonomice ale actinomicetelor. Frecvent studiată a fost structura peptidoglicanului (structura aminoacizilor) de tip *acil* a acidului muramic şi a compoziţiei glucidelor din peretele celular. Acidul diaminopimelic (ADP) a fost studiat prin cromatografie în strat subţire pe celuloză din hidrolizatul global, urmat de o colorare cu ninhidrină.

Tehnica permite separarea meso-ADP, hidroxi-ADP şi a stereoizomerilor LL-ADP şi DL-ADP. Tehnica s-a folosit şi la diferenţierea tulpinilor de *Bacillus*.

Membrana citoplasmatică. ***Quinonele*** sunt componente ale membranelor citoplasmatice. La bacterii s-au găsit două tipuri de quinone: ubiquinone şi menaquinone. Sunt importante în studiile taxonomice la bacterii Gram-pozitive, în special la actinomicete la care pot fi evidenţiate patru grupuri. Menaquinonele sunt notate MK-*n* (H*m*), unde *n* este numărul total de unităţi isoprene şi *m* numărul de unităţi isoprene saturate. Ele pot fi izolate din celule ca majoritatea lipidelor, prin extracţie în cloroform-etanol. Menaquinonele pot fi separate prin HPLC (*Hhigh Performance Liquid Chromatography*).

Determinarea fosfolipidelor. Fosfolipidele sunt componente ale membranei citoplasmatice la toate celulele vieţuitoarelor, cu excepţia archeobacteriilor la care fosfolipidele sunt înlocuite cu glicerol-eter. Sunt extrase cu solvenţi organici şi separate prin cromatografie în strat subţire. Pe baza studiilor efectuate pe fosfolipide, actinomicetele pot fi separate în cinci grupuri.

Acizii graşi. Sunt cunoscute două clase de acizi graşi: liniari şi ramificaţi, ultimii fiind specifici pentru bacteriile Gram-pozitive. Ei pot fi separaţi de lipidele polare din membrana citoplasmică prin esterificare şi prin gaz cromatografie sau cromatografie în strat subţire. La actinomicete pattern-ul acizilor graşi este în bună corelare cu filogenia acestui grup.

Membrana externă: acizii micolici. Acizii micolici sunt componentele principale ale membranei lipidice externe la *Mycobacterium, Corynebacterium* şi *Nocardia*. Ei pot fi diferenţiaţi după lungimea lanţului. Acizii micolici adevăraţi, izolaţi din *Mycobacterium*, au lanţul format din 60–80 atomi de carbon, în timp ce acizii micolici identificaţi la *Nocardia* şi *Corynebacterium* au lanţul format din 50 şi 30 atomi de carbon. Aceste genuri pot fi separate după lungimea lanţurilor acizilor micolici sub formă de metil esteri, prin cromatografie în strat subţire pe silicagel.

Produşii finali ai metabolismului. Sunt evidenţiaţi prin teste biochimice clasice, ca reacţia Voges-Proskauer sau testul roşu de metil. Ei pot fi studiaţi

cantitativ prin gaz-lichid cromatografie. Tehnicile putând fi computerizate sunt folositoare în studiile taxonomice în special la microorganisme anaerobe.

2.2.4. Taxonomia moleculară

ADN - cromozomal

Determinarea conținutului în guanină și citozină (% mol G+C). Studiile au demonstrat că, bazele azotate, purinele (*G* – guanină; *A* – adenină) și pirimidinele (*C* – citozină; *T* – timină) variază de la un organism la altul, dar conținutul acestora este constant în cadrul speciei.

Conținutul în *G* + *C* este dat de următoarea formulă:

$$\% \text{ mol } G + C = (G + C) \times 100 \, (A + T + G + C)$$

și poate fi determinat prin metode directe și indirecte. Determinarea directă a % molar *G* + *C* se realizează prin tehnica HPLC și se bazează pe hidroliza ADN, cu obținerea unui amestec de nucleotide din care se determină procentul tuturor bazelor azotate.

Determinarea indirectă constă în aprecierea conținutului *G* + *C* prin determinarea „temperaturii de topire" – t_m a ADN-ului, fiind tehnica frecvent utilizată în studiile de taxonomie. t_m – *melting midpoint* – reprezintă temperatura în grade Celsius la care, dintr-o masă de molecule ADN, jumătate se găsesc în stare dublu catenară și jumătate în stare monocatenară (denaturate).

Denaturarea este denumită topire (*melting*) deoarece încălzirea furnizează energia necesară ruperii legăturilor de hidrogen. Denaturarea începe în regiunile bogate în *A–T* și continuă în cele cu un conținut crescut în *G–C*.

Valorile t_m cresc direct proporțional cu conținutul în *G–C*, datorită cantității mai mari de energie necesară pentru a desface cele trei legături de hidrogen dintre guanină și citozină, spre deosebire de perechea *A–T*, care prezintă numai două legături de hidrogen.

Prezența bazelor purinice și pirimidice în structura ADN conferă acestuia proprietatea de adsorbție a radiațiilor UV cu $\lambda = 260$ nm, lungime de undă folosită pentru determinarea cantitativă a ADN. Adsorbția ADN dublu caternar (ADN*dc*) nativ la 260 nm este mai mică decât adsorbția mononucleotidelor sale componente, fenomenul fiind denumit efect hipocromic. Efectul hipocromic se datorează interacțiunii bazelor azotate din structura ADN, fapt care diminuează cantitatea de lumină ce poate fi adsorbită de fiecare bază. Dacă ADN este denaturat termic se produce o creștere a absorbției luminii la $\lambda - 260$ nm de circa 40%, în funcție de

tipul de ADN, fenomen cunoscut sub denumirea de efect hipercromic. Acest efect creşte cu conţinutul în *A–T*, iar temperatura de topire cu conţinutul în *G–C*. t_m este atins când aproximativ 50% din ADN*dc* devine monocatenar. t_m creşte cu creşterea concentraţiei de ioni şi descreşte în prezenţa formamidei sau dimetilsulfoxid (DMSO). Valorile adsorbţiei la 260 nm se înscriu în grafic, rezultând curba de efect hipercromic. În funcţie de t_m se exprimă % molar *G+C*, folosind formula Owen:

$$G + C = 2{,}08 * t_m - 106{,}4$$

Ca ADN de referinţă poate fi folosit ADN extras din *E. coli* K–12 care are un $t_m = 75{,}5$ şi un conţinut în *G+C* = 50,6 %.

Ca urmare a determinării compoziţiei ADN la o mare varietate de microorganisme se pot face următoarele corelări:

– organismele cu fenotipuri similare, adesea, dar nu totdeauna, posedă % molar similar de *G+C*;

– dacă două microorganisme sunt foarte apropiate fenotipic dar au % molar de *G+C* foarte deosebit, o examinare mai atentă arată că microorganismele nu sunt chiar atât de înrudite cum s-a presupus iniţial;

– două organisme pot avea % molar identic, dar să nu fie înrudite (taxonomic şi filogenetic), deoarece este posibilă o mare varietate de secvenţe ADN la aceeaşi compoziţie de baze.

Determinarea % molar de baze la organisme este necesară pentru identificarea unui gen nou sau a unei specii noi. În realitate procentul molar de *G+C* este un determinant negativ de excludere, întrucât o valoare apropriată din două surse diferite de ADN nu este obligatoriu să aibă secvenţe similare de ADN. Pe de altă parte, organisme cu diferenţe semnificative în conţinut molar *G+C* arareori au secvenţe ADN comune, altfel spus, % *G+C* este util pentru a demonstra că organismele nu sunt înrudite.

La bacterii conţinutul în *G+C* este variabil fiind cuprins între 25% (unele specii de *Clostridium*) şi 70% (unele specii de *Pseudomonas*).

Se admite că variabilitatea între aceleaşi specii trebuie să fie <2,5%. Această tehnică este frecvent aplicată în taxonomie. De exemplu, pe baza determinării conţinutului molar în *G+C* a fost posibilă excluderea speciei *Proteus morganii* (% molar *G+C* = 50%) din genul *Proteus* (conţinut molar *G+C* = 39–40%) şi transferarea acesteia în genul *Morganella* şi integrarea genului *Yersinia* (*G+C* = = 45,8 – 46,8), în *Enterobacteriaceae* (*G+C* = 45–58%). Totuşi, unii autori au demonstrat recent prin alte metode mai precise că bacteriile cu % *G+C* foarte diferit pot aparţine aceluiaşi gen.

Hibridare ADN/ADN. Omologia moleculelor de ADN presupune o referire la secvența în baze azotate a moleculelor luate în studiu. Secvențele ADN pot fi similare și complementare. Similaritatea între două secvențe este dată de existența unei identități în ceea ce privește proporția de baze (ADN*mc*) sau în perechi de baze (ADN*dc*). Complementaritatea este determinată de regulile de împerechere dintre adenină și timină, respectiv guanină și citozină, astfel încât să se respecte principiul complementarității catenelor în molecula de ADN*dc*. Complementaritatea poate fi măsurată direct prin capacitatea a două molecule de ADN de a hibridiza. Dacă două molecule de ADN sunt denaturate la monocatene, complementaritatea dintre cele două monocatene poate fi utilizată pentru a indica gradul de similitudine dintre cele două duplexuri parentale.

Capacitatea a două monocatene de a reface dublul helix pe bază de complementaritate se numește renaturare pentru ADN provenit de la aceeași sursă și hibridare pentru ADN provenit din surse diferite.

Procesul de renaturare, respectiv hibridare decurge în două trepte:

– cele două catene se întâlnesc aleator în soluție și, dacă secvențele lor sunt complementare, cele două molecule vor genera o regiune dublu catenară;

– regiunea dublu catenară se va extinde la nivelul întregii molecule, procesul putând fi asimilat cu închiderea unui fermoar („Zipper – like effect"). Renaturarea dublu helix restabilește proprietățile care s-au pierdut în timpul procesului de denaturare.

În prezent există numeroase tehnici de realizare a hibridării. Tehnicile diferă în ceea ce privește faza de renaturare care este, de obicei, lichidă, dar unii autori folosesc gel agaroză sau membrane (filtre) de nitroceluloză și tehnica de separare pentru ADN*mc* sau *dc*.

Hibridarea în soluție nu este cea mai eficientă metodă pentru determinarea gradului de înrudire dintre două probe de ADN, datorită faptului că în timpul amestecării celor două monocatene apar două tipuri de reacție și anume:

– catene complementare provenite din aceeași moleculă de ADN pot renatura cu refacerea moleculei originare;

– fiecare monocatenă a unei molecule de ADN dintr-o sursă poate hibrida cu alta, provenită din ADN-ul celeilalte surse. Acest neajuns poate fi eliminat prin imobilizarea monocatenelor provenite de la una din surse, astfel încât aceasta să nu poată renatura.

Hibridarea pe membrane de nitroceluloză necesită următoarele operațiuni:

– extracţia ADN şi marcarea radioactivă (^{32}P sau ^{3}H) a unui ADN, exemplu ADN *A* notat ca *A**;

– legarea ADN-ului *A* nemarcat pe filtru de nitroceluloză după denaturare termică (100°,5');

– fragmentarea ADN *A** şi *B* prin sonicare pentru a mări frecvenţa coliziunii fragmentelor heterologe;

– denaturarea termică a *A** şi *B*;

– hibridarea: va exista o competiţie între ADN *A** şi ADN *B* pentru ADN *A* fixat pe filtru.

Se vor reasocia aproximativ de 1500 ori mai mult *B* decât *A**, astfel că monocatena marcată va avea puţine ocazii de legare. După 16 ore de incubare la temperatura t_m =25°C, radioactivitatea de pe filtre va fi comparată cu controlul de 100% (ADN *B* este înlocuit cu *A*) şi 0% (amestec conţinând numai *A**).

Tehnica pe coloană de hidroxilapatită. Hidroxilapatita este un fosfat de calciu care permite separarea ADN*mc* de ADN*dc*. ADN-ul este legat de hidroxilapatită şi apoi eluat diferenţiat şi anume:

– cu tampon fosfat de molaritate mai mică de 0,20 m este eluat numai ADN*mc*;

– cu tampon fosfat de molaritate mai mare de 0,20 m sunt extrase toate mono şi dicatenele ADN *A*, *A** şi *B* sunt incubate la t_m = 25°C, timp de 16 ore, apoi trecute pe coloană de hidroxilapatită, menţinută la t_m = 25°C şi condiţionată cu tampon fosfat 0,14 m. După câteva spălări ADN-ul nehibridizat este eluat. Dacă tamponul de spălare nu este radioactiv, duplexurile sunt eluate cu tampon fosfat 0,3 m. Se compară apoi radioactivitatea fracţiunilor eluate.

Tehnica cu nuclează S1. Endonucleaza este extrasă din *Aspergillus oryzae* care separă ADN*dc* în ADN*mc*. ADN*dc* rămas este înlăturat din nucleotide prin precipitare cu acid tricloracetic şi adsorbţie pe dietilaminoetil celuloză (DEAE). Comparând radioactivitatea filtrelor care au adsorbit amestecul hibridizat după acţiunea nucleazei sau în lipsa acesteia, se poate deduce procentul de hibridare. ADN-ul trebuie la început să fie dializat, deoarece SDS inactivează nucleaza S1. Deoarece activitatea nucleazei depinde de concentraţia ADN, este necesar adaosul de ADN heterolog transportor (spermă de somon, sau timus de viţel).

Această tehnică face posibilă eliminarea monocatenei „ac de păr" (*hair pins*) (fig. 2.5).

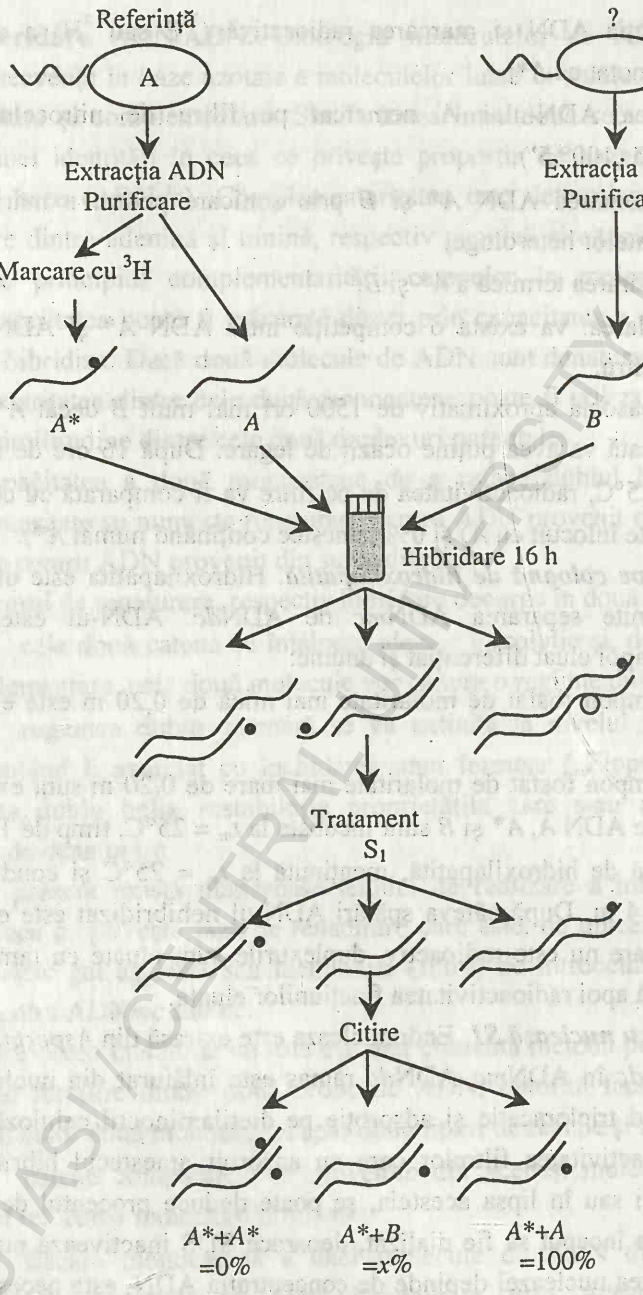


Fig. 2.5. Principiul hibridării prin tehnica cu nuclează S1. Există o competiție dintre AND *A** și ADN *B* pentru ADN *A*. Se vor amesteca aproximativ de 1500 ori mai mult *B* decât *A**, în așa fel ca monocatenele marcate să aibă puține șanse de reasociere. Tratamentul cu nuclează S1 elimină posibilitatea monocatenelor „ac de păr".

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tehnica optică. Constă în măsurarea vitezei renaturării hibridului. Este o tehnică rapidă și nu necesită folosirea izotopilor radioactivi. Inconvenientul constă în faptul că poate fi studiată o singură probă o dată, precum și în dificultatea studierii stabilității duplexurilor.

Stabilitatea hibrizilor. În timpul hibridării se formează două tipuri de hibrizi: *specifici*, corespunzător unor secvențe complementare, și *fragili*, în care două monocatene sunt față în față, dar au puține baze aranjate în secvențe complementare.

Stabilitatea hibrizilor și prin aceasta specificitatea lor poate fi măsurată prin studiul cineticii denaturării hibridului la o creștere treptată a temperaturii. $t_{m(e)}$ (punctul termal de eluție) este temperatura de topire a hibridului, adică temperatura la care 50% din radioactivitate poate fi eluată din duplex. Diferența stabilității termice $\Delta t_{m(e)}$, din $t_{m(e)}$ a heteroplexului și cea a hemoduplexului reprezintă gradul de stabilitate a heteroplexului. Numeroase studii au demonstrat că stabilitatea termică este corelată cu procentul de baze libere (1% baze libere pentru un $\Delta t_{m(e)}$ la 1,6°C).

Interpretarea rezultatelor. Cele trei tehnici hidroxilapatită, fixarea pe celuloză și metoda optică, dau rezultate similare. Metoda cu nuclează S1 dă valori ușor mai ridicate (10–15%) și de aceea în aprecierea rezultatelor se impune specificarea metodei folosite.

O valoare mai mică de 20% (pentru hidroxilapatită) sau 30% (pentru nucleaza S1) corespunde la o înrudire genetică slabă între microorganisme; de aceea, interpretarea trebuie să țină cont de valorile de omologie și stabilitate termică. O omologie superioară valorii de 70% și o bună stabilitate termică ($\Delta t_{m(e)} <= 5°C$) reprezintă un criteriu care atestă apartenența la aceeași specie.

În zona (30–70%) trebuie emisă ipoteza că cele două specii aparțin aceluiași gen. Indicele $t_{m(e)}$ este cel mai folositor în această zonă.

În ceea ce privește drojdiile, aceste valori sunt mai ridicate, situându-se între 80 și 100%. Utilizând metoda de determinare spectofotometrică, s-a stabilit că tulpinile de drojdii care prezintă 90–95% omologie de secvență ADN sunt conspecifice. Rămânând în domeniul drojdiilor, interpretarea datelor obținute în experiențele de reasociere ADN/ADN se complică, depinzând de tipul de ADN folosit, ADN total, ADN nuclear purificat, ADN mitocondrial sau ADN*r*. În acest sens, un rol important îl are prezența ADN repetitiv. Cum renaturarea este dependentă de numărul secvențelor de ADN complementare, este evident că ADN repetitiv va renatura mai repede decât cel non-repetitiv reprezentat de secvențe unice. De aceea, procesul de renaturare este rezultanta a două reacții: renaturarea rapidă a secvențelor de ADN repetitiv sau ADN mitocondrial, dacă este cazul, și renaturarea mai lentă a fragmentelor unice de ADN.

Se poate concluziona că procesul de reasociere a ADN este determinat de mărimea şi structura genomului care constituie factori importanţi în evaluarea gradului de omologie ADN/ADN.

Condiţiile de reacţie sunt, de asemenea, determinante în succesul reacţiei de reasociere astfel:

– creşterea tăriei ionice a mediului de reacţie creşte viteza de reacţie, în sensul că folosirea unui tampon salin citrat 2 × (0,15mM clorură de sodiu, 0,015 mM citrat de sodiu), *p*H = 7, permite parcurgerea procesului într-un timp relativ scurt;

– temperatura optimă de reasociere a ADN este cu 25...30 °C mai mică decât valoarea t_m;

– concentraţia iniţială a probei de ADN afectează viteza de reacţie, crescând conţinutul ADN în probe, între anumite limite.

ARN-ribozomal. Moleculele de ARN-ribozomal (ARN*r*) sunt considerate molecule de ceas sau cronometru molecular. În scopul reordonării în arbori filogenetici a genurilor de microorganisme şi chiar specii se folosesc moleculele de ceas molecular datorită, în principal, a trei parametri:

– constanţa fiziologică a moleculei la un număr foarte mare de organisme, ceea ce presupune că funcţia îndeplinită de molecule este supusă unei presiuni selective mari;

– molecula acoperă limite filogenetice mari;

– dimensiune suficient de mare a moleculei, ca să cuprindă suficient de multă informaţie.

Hibridare ADN/ARN. Tehnicile de hibridare ADN/ARN*r* sunt comparabile cu cele descrise la hibridarea ADN/ADN. Se realizează în mod obişnuit pe membrane de nitroceluloză. Din ribozomi va fi izolat ARN*r* total sau numai una sau două fracţii 16S sau 23S, vor fi marcate cu izotopi radioactivi şi hibridate cu ADN*mc* legat de membrana nitrocelulozică. Relaţia dintre cei doi ARN*r* este apreciată prin diferenţa dintre stabilitatea termică a hibrizilor.

Folosind această metodă se poate determina o omologie mai mare de 90% la speciile din familia *Enterobacteriaceae*. Cele cinci grupe genetice ale genului *Pseudomonas* au fost descrise pe baza hibridării ADN/ARN*r*.

Secvenţierea ARN*r*. ***Bacterii*** – speciile moleculare de ribozomi 5S şi 23S. Secvenţele de codificare pentru ARN*r* sunt printre moleculele cele mai înalt conservate în timpul evoluţiei. Studiile efectuate au făcut posibilă atât cunoaşterea relaţiilor dintre specii, cât şi dintre genuri şi grupuri de genuri.

Secvenţierea ARN*r* s-a efectuat pentru prima dată în 1970 în Urbana Illinois, S.U.A. Metoda constă în stabilirea, pentru fiecare organism studiat, a unei liste de oligonucleotide derivate din ARN*r* 16S, după hidroliză cu nuclează T1

extrasă din *Aspergillus oryzae*. A fost aleasă specia moleculară 16S, deoarece este mai stabilă decât ARN 5S şi mai uşor de secvenţializat decât ARN*r* 23S.

Principiul tehnicii este următorul: marcarea cu ^{32}P radioactiv *in vivo*, în timpul fazei de creştere, extracţia ARN, separarea ARN*r* 16S prin electroforeză în gel de poliacrilamidă, digestia cu nuclează T1 care va produce o breşă între gruparea 3'-acid guanilic şi gruparea 5'hidroxil a nucleotidului adiacent. Reziduurile sunt formate din 15–20 nucleotide şi conţin numai guanină la capătul 3'. Aceste nucleotide sunt separate prin electroforeză bidimensională: prima dimensiune pe acetat de celuloză la *p*H = 3,5 şi a doua dimensiune pe DEAE celuloză.

În aceste condiţii, spoturile formează trei, patru serii de *pattern*-uri sub formă de pană. Fiecare *pattern* corespunde numărului de uracil. În interiorul *pattern*-ului poziţia spotului depinde numai de compoziţia în adenină şi citrozină. Spoturile pot fi eluate şi studiate prin digestie cu ribonucleaze diferite şi migrare pe DEAE celuloză. În final este alcătuită o listă de oligonucleotide şi numărul de moli din fiecare. Compararea celor două organisme se face prin calcularea indexului de similaritate. Aplicarea metodei numerice de calcul va face posibilă clasificarea şi schiţarea unei dendograme.

Metodele de secvenţiere după amplificare prin PCR (*polymerase chain reaction*) a fost aplicată pentru studiul ARN 16S. Sunt folosiţi amplimeri (primeri corespunzători ARN 16S pentru amplificare). Această tehnică permite secvenţierea ARN 16S şi prin aceasta cunoaşterea poziţiei taxonomice a microorganismelor necultivabile.

Drojdii. Diferenţa dintre hărţile de restricţie, obţinute de la doi indivizi, este numită polimorfismul lungimii fragmentelor de restricţie (RFLP – *restriction fragment length polymorphism*). Acest polimorfism poate fi folosit ca un marker genetic în evaluarea genotipului.

În prezent, în taxonomia drojdiilor se foloseşte RFLP pe ADN*r*, adică pe secvenţe de ADN care codifică pentru diferite clase de ARN ribozomal. Rezultatul va fi de fapt o analiză comparativă a secvenţei moleculelor de ARN*r* (25S, 28S, 18S şi 5S), care a permis reordonarea în arborii filogenetici deja cunoscuţi a numeroase genuri, specii şi chiar tulpini de drojdii, precum şi recalcularea distanţei dintre acestea.

Interesul pentru studiul ARN*r* se datorează următoarelor caracteristici ale acestuia:

– ribozomii sunt prezenţi în toate organismele, au aceeaşi origine genetică la toate organismele vii;

– unele secvenţe de ARN*r* sunt înalt conservate şi omoloage pentru toate organismele şi servesc ca puncte de reper care permit utilizarea secvenţelor variabile ca unităţi de măsură a modificărilor survenite în cursul evoluţiei;

– genele pentru ARN*r* se găsesc în număr mare de copii şi, din această cauză, constituie un material propice pentru reacţiile de restricţie.

Pentru determinarea secvenţei ARN*r*, în prezent se practică două variante.

Într-o primă etapă se realizează amplificarea şi izolarea genelor din genomul de drojdie prin PCR:

– genele amplificate sunt clonate în vectori de tip fagimid (de exemplu, *p*Bluescript SK/KS +/–);

– prin transcriere *in vitro* în condiţii specifice pornind de la promotorii T7 sau T3 se obţin molecule de ARN mesager (ARN*m*) sens sau antisens;

– moleculele de ARN*m* obţinute sunt supuse secvenţierii.

Pe o populaţie heterogenă de drojdii sau bacterii se realizează hibridarea cu sonde marcate, corespunzătoare genelor pentru ARN*r* specific subunităţilor mari ale ribozomilor de la eucariote şi procariote (de exemplu 18S respectiv 16S).

– se realizează amplificarea şi izolarea prin PCR numai a genelor de interes – ARN*r* 18S pentru drojdii;

– se realizează restricţia ADN*r* 18S şi se deduce prezenţa ARN*r* 18S din secvenţa ADN*r* corespunzător.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology este un compendium de informaţii clasice şi moleculare referitoare la toate speciile de procariote şi conţine un număr de chei dicotome care permite identificarea lor. Deşi este un tratat de taxonomie şi nu de filogenie, ultima ediţie a manualului a încorporat şi unele informaţii privind studii de secvenţiere a moleculelor specifice pentru descrierea diferitelor grupuri de microorganisme.

Bergey's Manual este format din 4 volume. Volumul I conţine informaţii referitoare la bacterii Gram-negative de interes medical şi industrial; volumul II conţine informaţii referitoare la bacterii Gram-pozitive de interes medical şi industrial; volumul III conţine informaţii referitoare la bacteriile Gram-negative neincluse în volumul I, *Archaea* şi cianobacteriile; volumul IV conţine informaţii referitoare la bacteriile Gram-pozitive filamentoase formatoare de spori (*Actinomyces*). Descrierea genurilor existente în *Bergey's Manual* este cuprinsă în anexa 3 a cărţii.

Deşi *Bergey's Manual* recunoaşte contribuţia filogeniei moleculare la evoluţia bacteriilor, manualul descrie grupurile taxonomice clasice, întrucât nu este clar modul în care studiile de secvenţiere moleculară vor afecta aspectele de nomenclatură ale taxonomiei.

3. METABOLISMUL MICROBIAN

3.1. BAZELE METABOLISMULUI

În celule reacţiile nu decurg izolat, ci organizat în secvenţe multiple formând aşa-numita *cale metabolică*, în care produsul unei reacţii serveşte ca substrat reacţiei următoare. Ca urmare, diferitele căi se intersectează formând o reţea de reacţii biochimice integrate şi cu un scop final denumită *metabolism* (fig.3.1).

Metabolismul se studiază în mod obişnuit prin examinarea componentelor acestuia. Fiecare metabolism este compus din secvenţe multienzimatice şi fiecare enzimă, la rândul ei, poate exercita o acţiune catalitică sau reglatoare. Harta metabolică conţine căile centrale ale energeticii metabolismului, redate în figura 3.2.

Majoritatea căilor metabolice pot fi clasificate în *căi catabolice* (degradative) şi *căi anabolice* (sintetice). Reacţiile catabolice degradează molecule complexe ca proteine, poliglucide şi lipide, la câteva molecule simple, de exemplu CO_2, NH_3 şi apă. Calea anabolică formează produşi finali complecşi din precursori simpli.

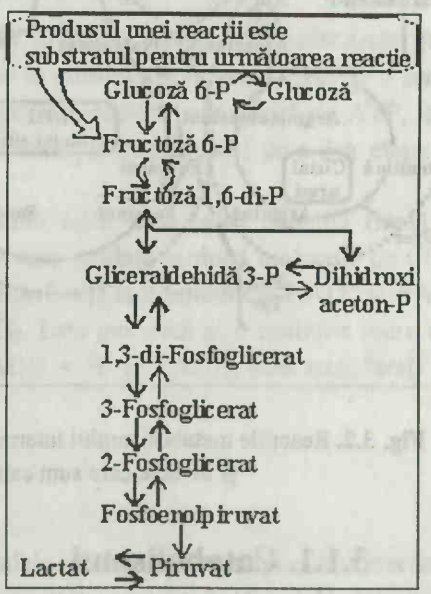


Fig. 3.1. Glicoliza. Săgeţile curbe indică direcţia reacţiilor catalizate de diferite enzime.

USAMV CLUJ-NAPOCA LIBRARY

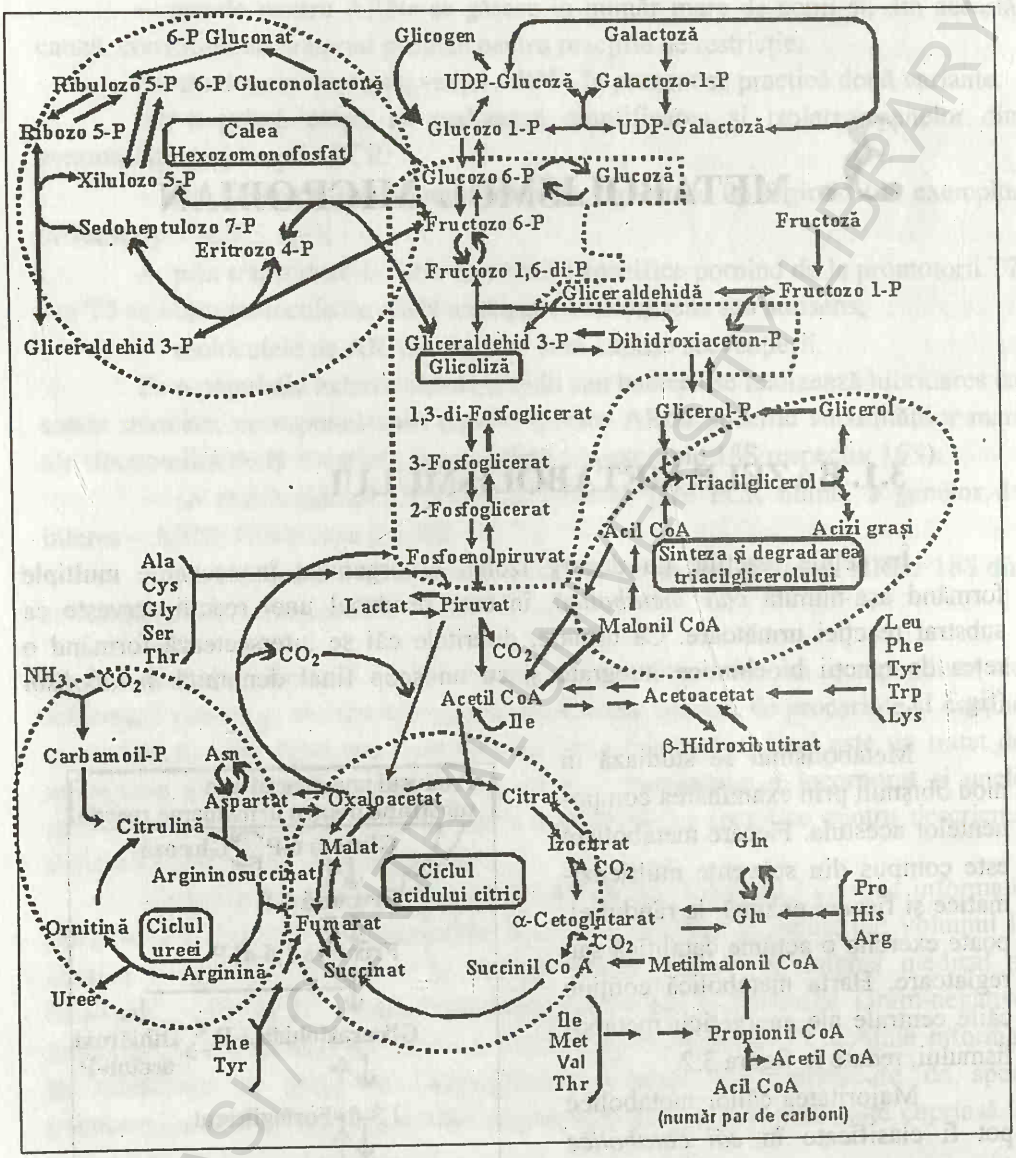


Fig. 3.2. Reacţiile metabolismului intermediar. Săgeţile curbe indică reacţiile directe şi inverse care sunt catalizate de diferite enzime.

3.1.1. Catabolismul

Reacţiile catabolice au rolul de a capta energia chimică (sub formă de ATP) prin degradarea moleculelor bogate în energie. Catabolismul generează, de asemenea, molecule care sunt convertite în „cărămizi" de construcţie, necesare sintezei de molecule complexe. Generarea energiei prin degradarea moleculelor

complexe se desfăşoară în trei etape (fig. 3.3), care sunt prezentate în cele ce urmează.

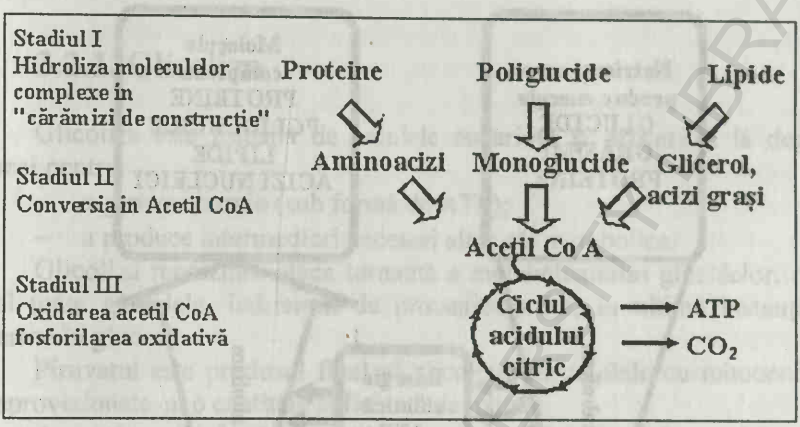


Fig. 3. 3. Etapele catabolismului.

Hidroliza moleculelor complexe în molecule mai mici. Moleculele complexe sunt degradate în molecule simple. De exemplu, proteinele sunt degradate în aminoacizi, poliglucidele în monoglucide şi trigliceridele în acizi graşi liberi şi glicerol.

Conversia în intermediari simpli. În etapa următoare moleculele mai mici, rezultate în prima fază, sunt degradate în continuare la acetil CoA şi o serie de alte molecule simple. O parte din energie este captată sub formă de ATP, dar cantitatea este mică comparativ cu cea produsă în timpul celei de-a 3-a etape a catabolismului.

Oxidarea acetil CoA. Ciclul acidului citric este calea comună finală a oxidării moleculelor de rezervă. Acetil CoA este oxidată la două molecule de CO_2 şi patru perechi de protoni (H) care sunt transferaţi la coenzimele NAD^+ şi FAD pentru producerea de NADH + H^+ şi $FADH_2$. Este generată şi o cantitate mare de energie din ATP, când electronii de la NADH + H^+ şi $FADH_2$ sunt transferaţi la oxigen în fosforilarea oxidativă.

3.1.2. Anabolismul

Reacţiile anabolice combină moleculele mici ca, de exemplu, aminoacizii, pentru a forma molecule complexe ca, de exemplu, proteinele (fig. 3.4). Reacţiile anabolice necesită energie, care este asigurată de transformarea ATP în ADP şi P_i. Calea de biosinteză pentru aceste molecule este în mod obişnuit diferită de calea degradativă, şi cele două procese răspund diferit la semnalele reglatoare. Reacţiile

anabolice presupun adesea reducere chimică, asigurată de NADPH care funcționează ca donor de electroni.

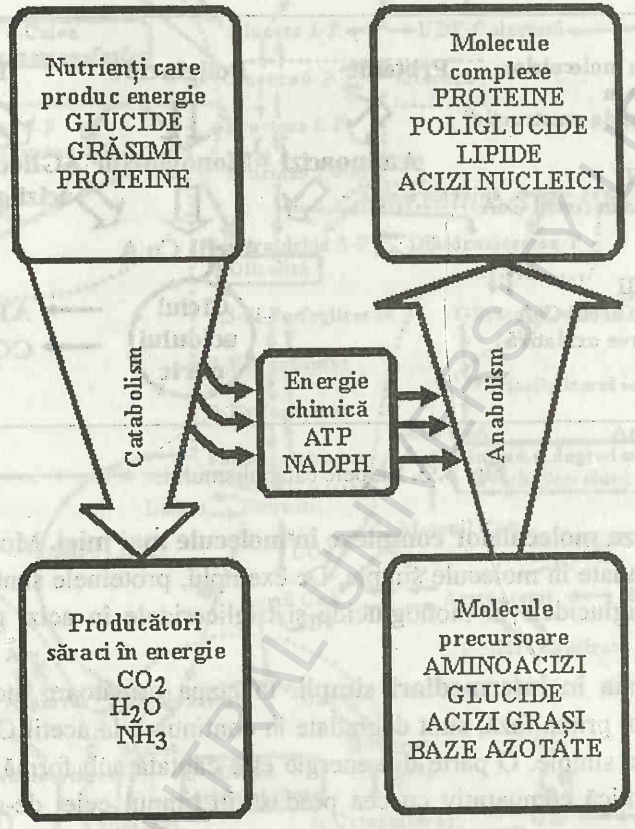


Fig. 3.4. Comparație între calea catabolică și calea anabolică.

În concluzie, catabolismul este un proces *convergent*, prin care o mare varietate de molecule sunt transformate în puține produse finale. Din contră, anabolismul este un proces *divergent*, în care câțiva precursori de biosinteză formează o largă varietate de complexe polimerice.

3.2. CĂI DE DEGRADARE A SUBSTRATULUI (CATABOLISM)

Principala sursă de carbon utilizată în procesele de biosinteză o constituie glucidele. Microorganismele metabolizează glucidele în mod diferit, în funcție de specie și de condițiile mediului exterior în care sunt obligate să se dezvolte.

Căile de degradare a substratului în celulele microbiene sunt, în general, comune cu cele ce au loc în orice fel de celule vii, cu modificările specifice survenite pentru fiecare caz în parte.

3.2.1. Glicoliza

Glicoliza este folosită de celulele eucariote şi procariote la degradarea glucozei pentru:

- a genera energie (sub formă de ATP);
- a produce intermediari necesari altor căi metabolice.

Glicoliza reprezintă placa turnantă a metabolismului glucidelor, deoarece virtual toate glucidele, indiferent de proveniența lor, în ultimă instanță pot fi convertite în glucoză.

Piruvatul este produsul final al glicolizei în celulele cu mitocondrii care sunt aprovizionate cu o cantitate suficientă de oxigen.

Această serie de 10 reacții este denumită ***glicoliză aerobă***, deoarece *oxigenul* este necesar pentru reoxidarea NADH + H^+ format în timpul oxidării gliceraldehidei-3-fosfat (fig. 3.5, *a*). Glicoliza aerobă asigură decarboxilarea oxidativă a piruvatului la acetil CoA, *combustibilul* de bază pentru inițierea ciclului acizilor tricarboxilici. Alternativ, glucoza poate fi convertită la piruvat, care este redus de NADH + H^+ pentru formarea lactatului (fig. 3.5, *b*). Această degradare a glucozei la lactat este denumită *glicoliză anaerobă*, deoarece nu are loc o formare de NADH şi, deci, poate avea loc în absența O_2. Glicoliza anaerobă permite producția continuă de ATP în celulele lipsite de mitocondrii.

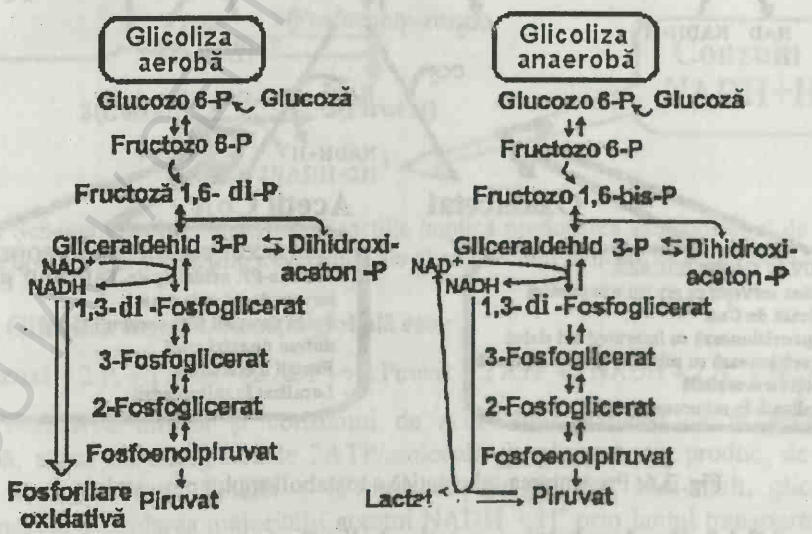


Fig. 3.5. Glicoliza, una dintre căile esențiale ale metabolismului energetic:
a – reacțiile glicolizei aerobe; *b* – reacțiile glicolizei anaerobe.

3.2.1.1. Căi alternative de transformare a piruvatului

Decarboxilarea oxidativă a piruvatului. Decarboxilarea oxidativă a piruvatului de către complexul piruvat dehidrogenaza reprezintă o cale importantă, cu capacitate oxidativă ridicată atât în mușchiul cardiac cât și la microorganisme (fig. 3.6). Piruvat dehidrogenaza convertește ireversibil piruvatul, metabolitul final al glicolizei, în acetil CoA, produs major pentru ciclul acizilor tricarboxilici (TCA) și al produșilor necesari sintezei acizilor grași.

Carboxilarea piruvatului la oxaloacetat. Carboxilarea piruvatului la oxaloacetat cu ajutorul piruvat carboxilazei reprezintă o reacție dependentă de biotină (fig. 3.6). Această reacție este importantă pentru că reaprovizionează ciclul acizilor tricarboxilici cu intermediari și asigură substratul pentru gluconeogeneză.

Reducerea piruvatului la metanol. Conversia piruvatului la metanol are loc în 2 etape incluse în figura 3.6; decarboxilarea piruvatului prin piruvat decarboxilază are loc la drojdii și unele microorganisme, și nu în celula animală. Enzima necesită tiaminpirofosfat drept coenzimă și catalizează reacții similare cu cele descrise pentru piruvat dehidrogenază.

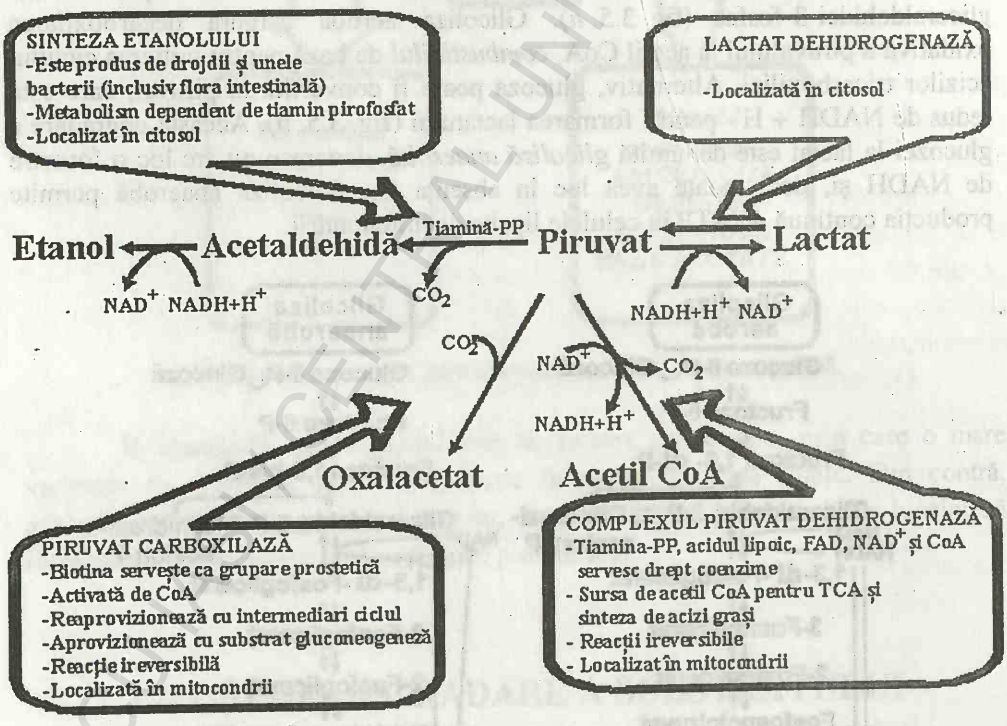


Fig. 3.6. Prezentarea schematică a metabolismului piruvatului.

3.2.1.2. Randamentul energetic al glicolizei

Glicoliza anaerobă. Reacția globală este următoarea:

$$\text{Glucoză} + 2\ P_i + 2\ ADP \rightarrow 2\ \text{Lactat} + 2\ ATP + 2\ H_2O$$

Producerea de ATP. Sunt generate 2 molecule de ATP pentru fiecare moleculă de glucoză convertită în lactat (fig. 3.7). Deşi glicoliza anaerobă eliberează numai o mică fracţiune de energie conţinută în molecula de glucoză, aceasta este o sursă de energie valoroasă în unele condiţii şi anume când aprovizionarea cu oxigen este limitată sau în ţesuturi lipsite de mitocondrii.

Producerea de NADH+ H^+. În glicoliza anaerobă nu are loc o producere sau un consum net de NADH; NADH+ H^+ format de gliceroaldehid-dehidrogenaza este folosit de lactatdehidrogenază pentru reducerea piruvatului la lactat (fig. 3.7). Se produc 2 molecule de lactat pentru fiecare moleculă de glucoză metabolizată.

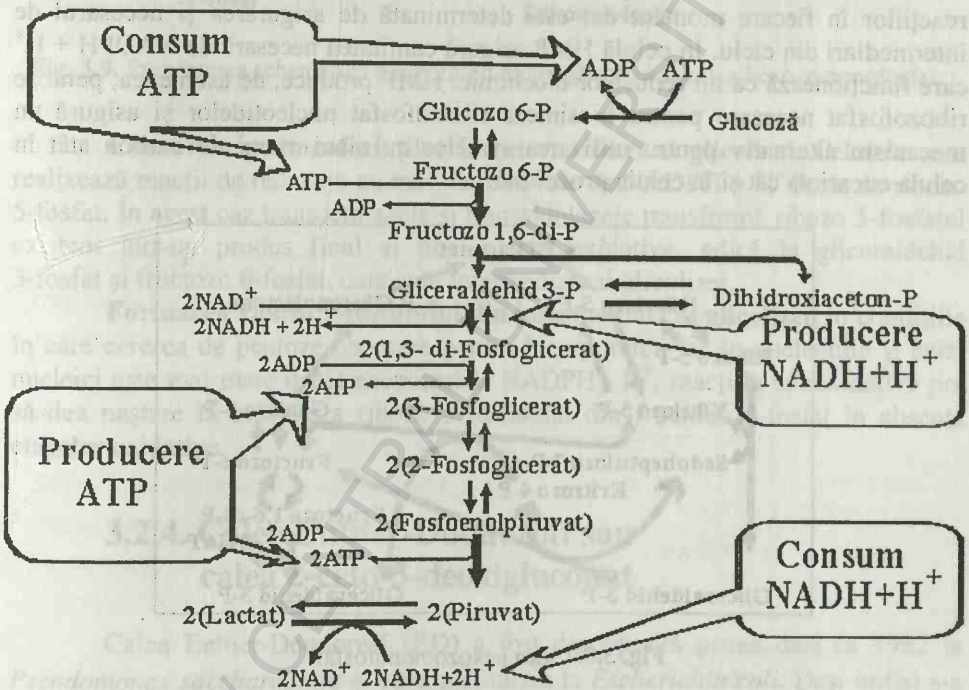


Fig. 3.7. Schema glicolizei anaerobe. Reacţiile implică producerea sau consumul de ATP sau NADH + H^+. Reacţiile ireversibile ale glicolizei sunt indicate cu săgeţi mari.

Glicoliza aerobă. Reacţia globală este:

$$\text{Glucoză} + 2\ P_i + 2\ NAD^+ + 2\ ADP \rightarrow 2\ \text{Piruvat} + 2\ ATP + 2\ NADH + 2\ H^+ + H_2O$$

Formarea directă şi consumul de ATP sunt aceleaşi ca în glicoliza anaerobă, adică un câştig net de 2ATP/moleculă de glucoză. Se produc, de asemenea, 2 molecule de NADH + H^+/moleculă de glucoză. Mai mult, glicoliza aerobă necesită oxidarea majorităţii acestui NADH + H^+ prin lanţul transportor de electroni. Produşii finali ai glicolizei, piruvatul sau lactatul, conţin încă majoritatea energiei blocate în glucoză. Ciclul acizilor tricarboxilici este necesar pentru eliberarea completă a acestei energii.

3.2.2. Calea hexozomonofosfaților

Calea hexozomonofosfaților (HMP) – denumită, de asemenea, calea pentozofosfaților sau fosfogluconatului – este formată din două reacții ireversibile, urmată de o serie de interconversiuni de intermediari fosforilați (fig. 3.8). În ciclu nu se consumă sau nu se produce direct ATP. Carbonul 1 al glucozo 6-fosfatului este eliberat ca CO_2 și două molecule de NADPH + H^+ pentru fiecare glucozo 6-fosfat intrat în etapa oxidativă a ciclului. Spre deosebire de glicoliză sau ciclul acidului citric, în care direcția reacțiilor este bine definită, reacțiile de interconversiune ale ciclului HMP pot funcționa în diferite direcții. Viteza și direcția reacțiilor în fiecare moment dat este determinată de asigurarea și necesarul de intermediari din ciclu. În celulă HMP asigură cantitatea necesară de NADPH + H^+ care funcționează ca un reducător biochimic. HMP produce, de asemenea, pentoze ribozofosfat necesare pentru biosinteza ribozofosfat nucleotidelor și asigură un mecanism alternativ pentru utilizarea surselor cu cinci atomi de carbon atât în celula eucariotă cât și în celula procariotă.

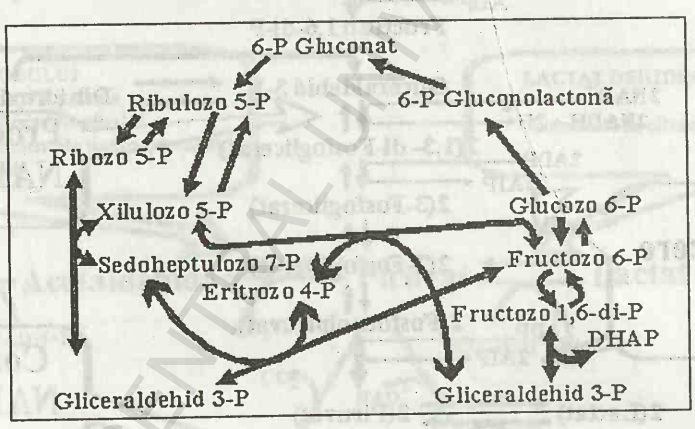


Fig. 3.8. Calea hexozomonofosfat.

3.2.3. Conexiuni între calea glicolizei și calea hexozomonofosfat

Transformarea gliceraldehid 3-fosfatului în piruvat. Gliceraldehid 3-fosfatul poate fi transformat în piruvat de către bacterii aero-anaerobe, drojdii și fungi după formula:

$$\text{Glucoză} + 6\ NADP^+ \rightarrow \text{Piruvat} + 3\ CO_2 + 6\ NADPH + H^+$$

Gliceraldehid 3-fosfatul poate fi condensat, de asemenea, cu fructozo 6-fosfatul de către gliceraldehid P-aldolaza, prezentă la bacteriile aerobe după formula:

$$2\ \text{Gliceraldehid 3-fosfat} \rightarrow \text{Fructozo-6-fosfat} + P_i$$

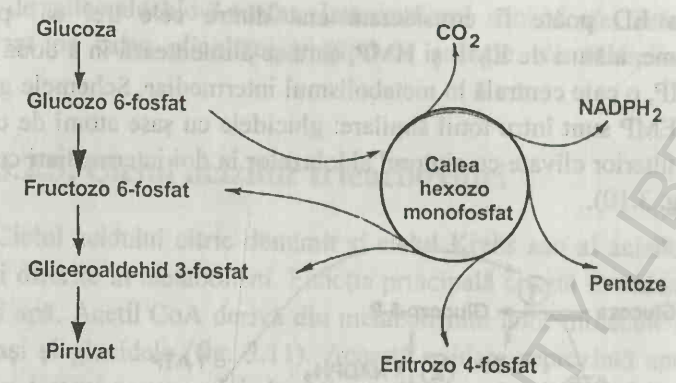


Fig. 3.9. Prezentarea schematică a raportului dintre glicoliză şi calea hexozomonofosfat.

Conversia pentozofosfaţilor în intermediari ai glicolizei. Celulele care realizează reacţii de reducere au mai mare nevoie de NADPH + H^+ decât de ribozo 5-fosfat. În acest caz transcetolazele şi transaldolazele transformă ribozo 5-fosfatul existent într-un produs final al unei reacţii oxidative, adică în gliceraldehid 3-fosfat şi fructozo 6-fosfat, care sunt intermediari ai glicolizei.

Formarea ribozo 5-fosfatului din intermediari ai glicolizei. În condiţiile în care cererea de pentoze necesare pentru încorporarea lor în nucleotide şi acizi nucleici este mai mare decât necesarul în NADPH+ H^+, reacţiile nonoxidative pot să dea naştere la biosinteza ribozo 5-fosfatului din fructozo 6-fosfat în absenţa etapelor oxidative.

3.2.4. Calea Entner-Doudoroff sau calea 2-ceto-3-deoxigluconat

Calea Entner-Doudoroff (ED) a fost descoperită prima dată în 1952 la *Pseudomonas saccharophila* şi ceva mai târziu la *Escherichia coli*. Deşi iniţial s-a considerat a fi specifică pentru tulpinile Gram-negative, calea ED este prezentă la cele trei ramuri filogenetice, incluzând şi *Archaea*. Ubicuitatea căii ED sugerează importanţa mult mai mare a acesteia în natură decât s-a recunoscut iniţial. Studii recente asupra evoluţiei căii glicolitice sugerează că ED a precedat calea EMP.

Biochimia şi fiziologia metabolismului acizilor zaharici la *E. coli*, precum şi noi gene care codifică transportorii acizilor zaharici, proteinelor reglatoare asociate şi noua cale catabolică a acizilor zaharici au putut fi identificate ca urmare a „proiectului genomului la *Escherichia coli*" (1997). Studiile au relevat că genele căii ED sunt prezente, de exemplu, în genomul de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* etc., fiind astfel evident că această cale ar putea fi una adiţională sau chiar nouă, după cum relevă analiza genetică a genomului microorganismelor citate mai sus.

Calea ED poate fi considerată una dintre cele trei căi prezente la microorganisme, alături de EMP şi HMP, care se alimentează în a doua jumătate a glicolizei EMP, o cale centrală în metabolismul intermediar. Schemele generale ale căilor ED şi EMP sunt întru totul similare: glucidele cu şase atomi de carbon sunt fosforilate şi ulterior clivate cu ajutorul aldolazelor în doi intermediari cu trei atomi de carbon (fig. 3.10).

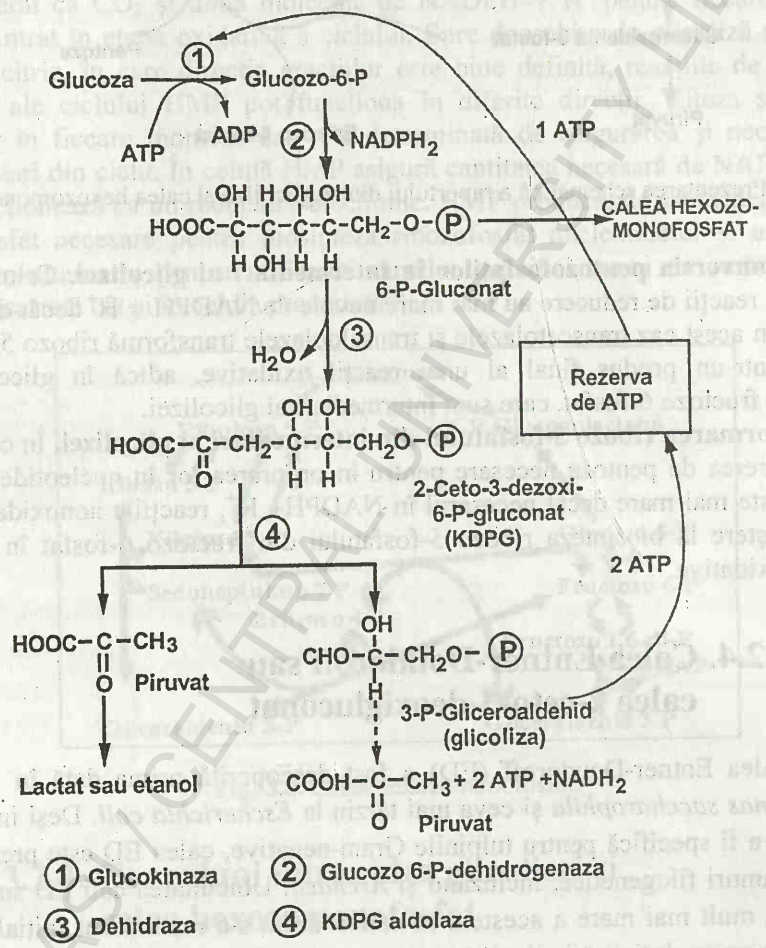


Fig. 3.10. Calea Entner-Doudoroff.

Prima deosebire între cele două căi constă în natura atomului C6 a metabolitului care serveşte ca substrat pentru clivarea aldolazică: pentru ED acest intermediar este **2 ceto-3 deoxi-6-fosfogluconat (CDPG)**. Prima din cele două enzime este unică pentru calea ED, 6-fosfogluconat dehidrataza (Edd) care catalizează dehidratarea 6-fosfogluconat cu formare de CDPG. Cea de-a doua enzimă a căii ED, CDPG aldolaza (Eda), catalizează o clivare aldol a CDPG cu

formare de gliceraldehid-3-fosfat. Intermediarul triozofosfat este în continuare metabolizat pe calea glicolizei şi produce energie *via* fosforilare la nivel de substrat.

3.2.5. Ciclul acizilor tricarboxilici

Ciclul acidului citric denumit şi ciclul Krebs sau al acizilor tricarboxilici are roluri diferite în metabolism. Funcţia principală constă în oxidarea acetil CoA la CO_2 şi apă. Acetil CoA derivă din metabolismul unor molecule ca aminoacizii, acizii graşi şi glucidele (fig. 3.11). Această oxidare reprezintă aproximativ două treimi din totalul consumului de oxigen şi al producţiei de ATP la majoritatea organismelor animale, incluzând şi omul. Ciclul acidului citric participă, de asemenea, la un număr mare de reacţii de sinteză. De exemplu, ciclul participă la formarea glucozei din scheletul de carbon al aminoacizilor şi asigură „cărămizi de bază" pentru sinteza hemului. Ciclul este caracteristic pentru o serie de microorganisme.

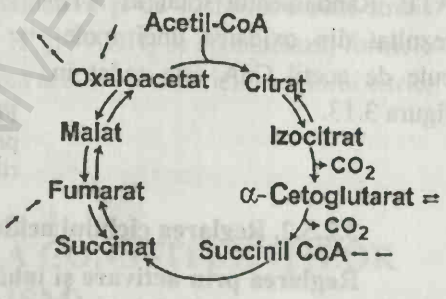


Fig. 3.11. Ciclul acidului citric.

Iniţial, în ciclul acidului citric, oxalacetatul este condensat cu acetat, fiind regenerat la încheierea ciclului. Totuşi, aceste reacţii trebuie privite nu numai ca un ciclu închis, ci mai de grabă ca un ciclu de trafic prin care o serie de compuşi intră şi ies după necesităţi.

Compexul piruvat dehidrogenază este un complex multienzimatic. Converteşte piruvatul, produsul final al glicolizei, în acetil CoA, substratul major pentru ciclul acidului citric (fig. 3.12). Ireversibilitatea reacţiei împiedică formarea piruvatului din acetil CoA şi explică de ce glucoza nu poate fi formată din acetil CoA în gluconeogeneză. Piruvat dehidrogenaza nu face parte propriu-zis din ciclul acidului citric, dar este o sursă importantă de acetil CoA, substrat cu doi atomi de carbon necesar ciclului.

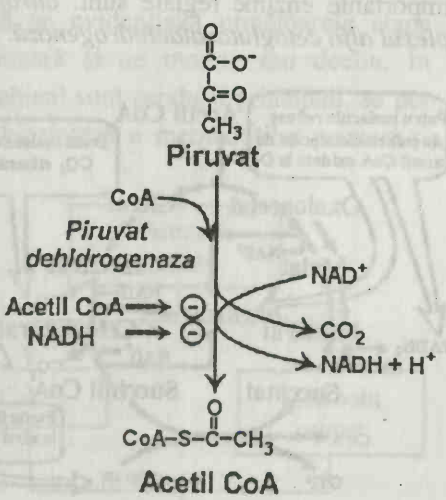


Fig. 3.12. Decarboxilarea oxidativă a piruvatului.

3.2.5.1. Stoichiometria ciclului acidului citric

$$\text{Acetil CoA} + 3\,NAD^+ + FAD + GDP + P_i + 2H_2O \rightarrow$$
$$\rightarrow 2\,CO_2 + 3\,NADH + FADH_2 + GTP + 3H^+ + CoA$$

Rezultatul reacției. În ciclu intră doi atomi de carbon sub formă de acetil CoA şi ies tot doi sub formă de CO_2. Ciclul nu include un consum sau producție netă de oxaloacetat sau orice alt intermediar. Patru perechi de protoni sunt transferați în timpul unui parcurs de ciclu: trei perechi de protoni reduc NAD^+ la $NADH+H^+$ şi o pereche reduce FAD la $FADH_2$.

Randamentul de ATP. Oxidarea unui NADH prin lanțul transportor de electroni conduce la formarea a trei ATP, în timp ce oxidarea $FADH_2$ produce doi ATP. Randamentul total al ATP rezultat din oxidarea unei molecule de acetil CoA este redat în figura 3.13.

Reacții producătoare de energie	Număr de ATP formați
3 NADH ⟶ 3 NAD^+	9
$FADH_2$ ⟶ FAD	2
GDP + P_i ⟶ GTP	1
	12 ATP/acetil CoA oxidată

Fig. 3.13. Numărul de molecule ATP produse prin oxidarea acetil CoA (folosind atât fosforilarea la nivel de substrat, cât şi cea oxidativă).

3.2.5.2. Reglarea ciclului acidului citric

Reglarea prin activare şi inhibiție a activității enzimelor. În contrast cu glicoliza care este reglată inițial, în principal de *fosfofructokinază*, ciclul acidului citric este controlat prin reglarea activității mai multor enzime (fig. 3.14). Cele mai importante enzime reglate sunt: *citratsintetaza, izocitrat dehidrogenaza şi complexul alfa cetoglutaratdehidrogenază.*

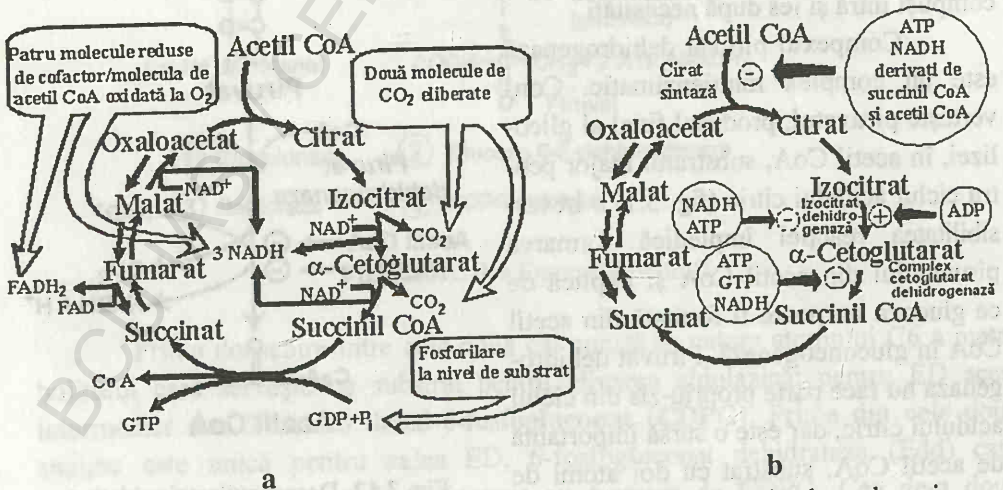


Fig. 3.14. Reglarea ciclului acidului citric: *a* – producerea coenzimelor reduse şi CO_2 în ciclul acidului citric; *b* – inhibitori şi activatori ai ciclului.

Reglarea prin ADP. Concentrațiile în ADP pot să fie crescute și scăzute.

Efectul ADP în concentrații crescute. Consumul de energie, pentru reacțiile de biosinteză sau alte procese conduc la hidroliza ATP în ADP și P_i. Creșterea consecutivă a concentrației ADP accelerează viteza reacțiilor care folosesc ADP pentru generare de ATP, cea mai importantă fiind fosforilarea oxidativă. Producția de ATP crește până ce se egalează cu viteza de consum a ATP-ului, în reacțiile care necesită energie.

Efectul concentrației scăzute de ADP. Dacă ADP sau P_i este în concentrații limitate, formarea de ATP prin fosforilare oxidativă descrește datorită lipsei acceptorului de fosfor (ADP) sau fosforului anorganic (P_i). Viteza fosforilării oxidative este proporțională cu [ADP] [P_i]/ [ATP]. Acest fenomen este cunoscut drept control respirator al producerii de energie. Oxidarea NADH + H^+ și $FADH_2$ prin lanțul respirator se oprește, de asemenea, dacă ADP este în concentrație limită. Aceasta se datorează faptului că procesele oxidative și de fosforilare sunt strâns legate și pot decurge simultan. Dacă NADH+ H^+ și $FADH_2$ se acumulează, formele lor oxidative se epuizează determinând oxidarea acetil CoA în ciclul acidului citric, prin lipsa enzimelor oxidative.

3.3. CĂI DE BIOSINTEZĂ A CONSTITUENȚILOR CELULARI (ANABOLISM)

În procesele de creștere microbiană se evidențiază următoarele etape constând din fazele: *lag*, logaritmică, staționară și de moarte sau declin. În procesele industriale în care metaboliții microbieni sunt produșii principali, se pot corela fazele de multiplicare cu etapele de biosinteză a metaboliților primari și secundari.

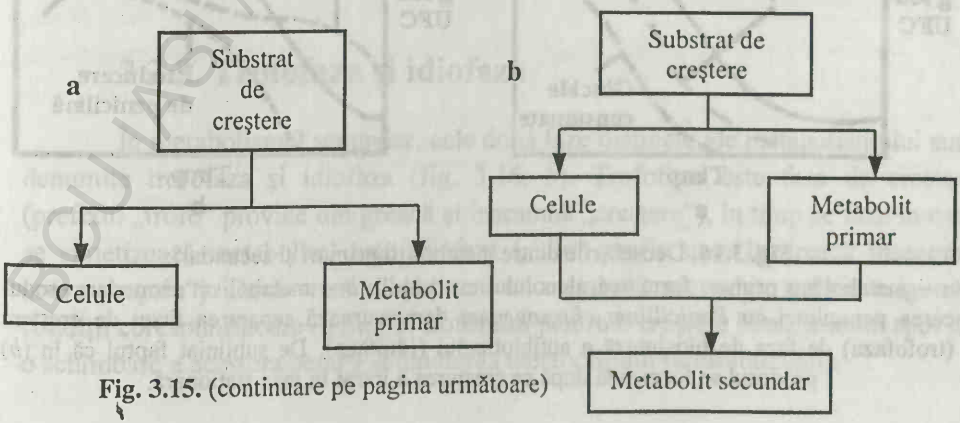


Fig. 3.15. (continuare pe pagina următoare)

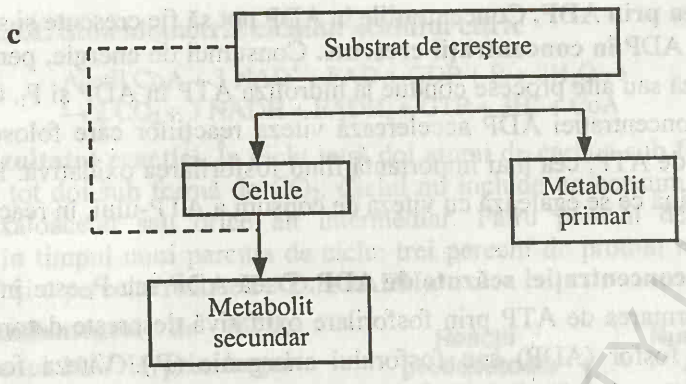


Fig. 3.15. Diferenţa dintre metabolismul primar şi secundar: *a* – celulele şi metaboliţii sunt produşi aproximativ simultan; *b* – după formarea celulelor şi metabolitului primar, celulele transformă metabolitul primar în metabolit secundar; *c* – după dezvoltarea celulelor, substratul de creştere rămas este transformat în metabolit secundar.

Metaboliţii primari se formează în faza de creştere logaritmică a microorganismelor, în timp ce *metaboliţii secundari* se formează la sfârşitul fazei de creştere şi, frecvent, la începutul sau în timpul fazei staţionare.

Deosebirea dintre metaboliţii primari şi secundari este redată în figura 3.15.

3.3.1. Metaboliţii microbieni primari

Procesul microbian tipic în care se formează un metabolit primar, în timpul fazei de creştere exponenţiale (*log*), este *fermentaţia alcoolică*.

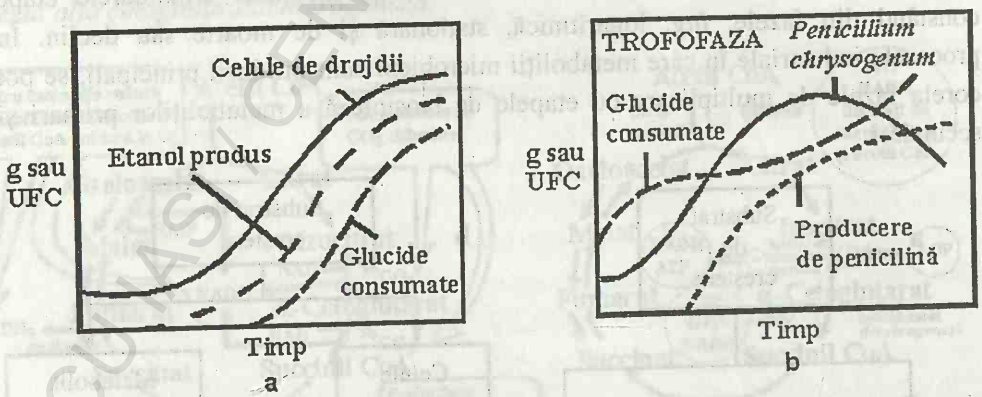


Fig. 3.16. Deosebirile dintre metaboliţii primari şi secundari: *a* – metabolism primar: formarea alcoolului cu drojdii; *b* – metabolism secundar: producerea penicilinei cu *Penicillium chrysogenum* demonstrează separarea fazei de creştere (trofofaza) de faza de biosinteză a antibioticului (idiofaza). De subliniat faptul că în (*b*) produsul se formează după ce creşterea a intrat în faza staţionară.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Etanolul este un produs al metabolismului anaerob al drojdiilor şi al unor bacterii şi reprezintă în acelaşi timp o parte a metabolismului energetic. Deoarece creşterea poate avea loc numai cu consum de energie, formarea etanolului decurge paralel cu creşterea. În fermentaţia alcoolică tipică (fig. 3.16) se formează biomasă şi etanol, concomitent cu consum de sursă de carbon (glucid).

3.3.2. Metaboliţii microbieni secundari

Metaboliţii care se formează la începutul sau în timpul fazei staţionare sunt denumiţi metaboliţi secundari şi sunt cei mai comuni şi importanţi metaboliţi de interes industrial. Cei mai cunoscuţi metaboliţi secundari studiaţi intensiv sunt antibioticele. Figura 3.16, *b* reprezintă cinetica procesului de biosinteză a penicilinei.

În timp ce metabolismul primar este în general asemănător la toate celulele, metabolismul secundar diferă de la un organism la altul.

Caracteristicile metabolismului secundar sunt următoarele:

– fiecare metabolit secundar este sintetizat de un număr mic de microorganisme;

– metabolitul nu pare a fi esenţial pentru creşterea şi înmulţirea microorganismului;

– formarea metabolitului secundar este extrem de dependentă de condiţiile de creştere, în special de compoziţia mediului. Apare frecvent fenomenul de represie a sintezei metabolitului;

– metabolitul secundar sintetizat de microorganism se prezintă sub forma unui amestec de substanţe cu structură chimică înrudită. De exemplu, o tulpină a unei specii de *Streptomyces* produce până la 32 de antracicline înrudite;

– adesea, poate fi obţinută o supraproducţie de metabolit secundar, deşi metaboliţii primari, produşi de metabolismul primar, nu sunt sintetizaţi în cantitate mare.

3.3.3. Trofofaza şi idiofaza

În metabolismul secundar, cele două faze distincte ale metabolismului sunt denumite trofofaza şi idiofaza (fig. 3.16, *b*). Trofofaza este faza de creştere (prefixul „trofo" provine din greacă şi înseamnă „creştere"), în timp ce faza în care se sintetizează metabolitul este idiofaza („idio" prefix care în greacă înseamnă „ceva propriu"). Dacă vrem să obţinem un metabolit secundar, trebuie asigurate condiţii corespunzătoare în timpul trofofazei pentru o creştere bună, urmată apoi de o schimbare a acestora pentru acumularea metabolitului (antibioticului).

În metabolismul secundar, produsul poate să ia naştere dintr-un intermediar format prin transformarea substratului de creştere. Altfel spus, metabolitul secundar este în general format dintr-o suită de produşi intermediari care se acumulează fie în mediul de cultură fie în celulă în timpul metabolismului primar.

Una dintre caracteristicile metaboliţilor secundari constă în aceea că enzimele implicate în metabolismul secundar sunt reglate separat de enzimele metabolismului primar. În unele cazuri au fost identificaţi *inductori ai metabolismului secundar*. De exemplu, a fost identificat un inductor pentru sinteza streptomicinei, un compus denumit Factor A.

3.3.4. Relaţia între metabolismul primar şi secundar

Majoritatea metaboliţilor secundari sunt molecule complexe care necesită pentru sinteza lor prezenţa unui număr mare de reacţii enzimatice.

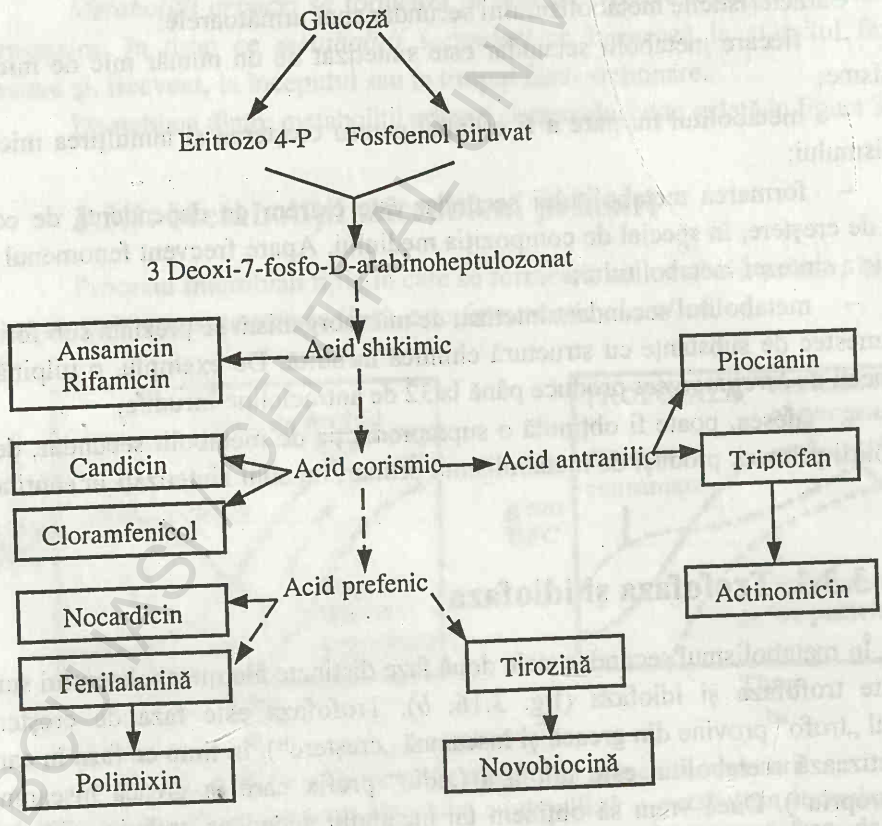


Fig. 3.17. Relaţia dintre calea metabolică primară pentru sinteza aminoacizilor aromatici şi formarea unei serii de metaboliţi secundari conţinând nucleu aromatic.

Notă: Schema anterioară este o schemă compozită a proceselor care apar la diferite microorganisme. Nici un microorganism nu sintetizează toţi produşii indicaţi în schemă. Astfel, este cunoscut faptul că în sinteza tetraciclinei sunt implicate cel puţin 72 de etape enzimatice, peste 25 de etape în sinteza eritromicinei, nici una dintre etape nefiind evidenţiată în metabolismul primar. Calea metabolică a metaboliţilor secundari se desfăşoară separat de cea a metabolismului primar, deşi „materialul de plecare" provine din calea metabolică majoră de biosinteză. În figura 3.17 sunt arătate interrelaţiile căii metabolismului primar principal pentru sinteza aminoacizilor aromatici cu metabolismul secundar pentru o serie de antibiotice.

3.4. FERMENTAŢII DERIVATE DIN CĂILE DE BIOSINTEZĂ

3.4.1. Fermentaţii derivate din calea hexozomonofosfatului

Fermentaţia heterolactică. Fermentaţia şi-a căpătat denumirea de heterolactică datorită faptului că în final se obţine, în afară de lactat şi etanol, dioxid de carbon şi eventual acetat. Bacteriile posedă în echipamentul lor enzimatic gliceraldehidfosfat-dehidrogenaza şi sunt lipsite de alte enzime ale ciclului glicolitic şi anume de fructozo-6-fosfatkinaza. Există mai multe sisteme de fermentaţie heterolactică la bacterii:

La *Lactobacillus* şi *Leuconostoc*, în condiţii facultativ anaerobe, are loc fosforilarea xilozei. Pentozofosfo-cetolaza va cliva compusul C5 în acetil P(C2) şi trioz-P(C3). În anaerobioză se formează etanol din acetil-P şi o moleculă de ATP. În aerobioză se formează cantităţi variabile de acetat şi două molecule de ATP.

La *Bifidobacterium*, în afară de acid lactic, se formează acetat. În această cale se găsesc în acelaşi timp etape din calea hexozomonofosfat şi din calea urmată la *Lactobacillus;* este prezentă pentulozofosfat cetolaza. Clivarea fructozo 6-fosfat se realizează prin intermediul fructozo6-fosfocetolazei.

La *Acetobacter* (*A. xylinum*) şi *Gluconobacter* are loc în condiţii de anaerobioză o fermentaţie acetică derivată din calea hexozomonofosfat.

Fermentaţia gluconică. O mare varietate de microorganisme, în special fungi (*Aspergillus*, *Penicillium*), precum şi bacteriile *Pseudomonas* şi *Acetobacter* oxidează glucoza la gluconat fără o fosforilare prealabilă, cum este cazul la lactobacilii heterolactici sau microorganisme care folosesc calea Entner-Doudoroff. Glucoza este transformată în gluconolactonă datorită unei oxidări directe cu ajutorul oxigenului. Reacţia este catalizată de glucozoxidază, care are drept

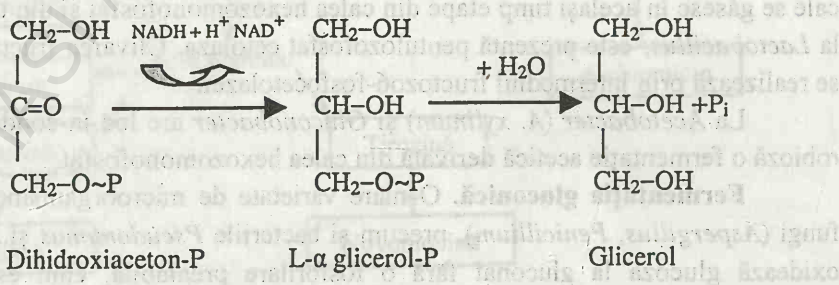
cofactor flavinele. Gluconolactona este apoi hidratată în acid gluconic. Produsul de fermentație este constituit dintr-un amestec de acid gluconic și de δ- și γ-lactone. Acidul gluconic este recuperat prin precipitare sub formă de gluconat de calciu. Fermentația necesită o aerație puternică. Gluconatul de calciu este folosit în medicină în carențe de calciu. Glucozoxidaza este folosită pentru eliminarea glucozei din produsele alimentare. Unele bacterii produc în timpul fermentației gluconice diverși acizi oxogluconici.

Fermentația alcoolică. Diferite microorganisme, în special bacteriile strict anaerobe sau facultativ anaerobe metabolizează piruvatul în anaerobioză pe căi diferite. Fermentația alcoolică este răspândită la drojdii (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*), în timp ce bacteriile producătoare de alcool sunt mai puțin numeroase (*Zymomonas mobilis*). Această fermentație este importantă pentru producerea unei game largi de băuturi alcoolice.

Glicoliza reprezintă prima mare etapă a fermentației alcoolice la drojdii. În cazul bacteriei *Zymomonas mobilis*, degradarea glucozei se face pe calea Entner-Doudoroff. Ambele căi duc la formarea acidului piruvic. În timpul fermentației alcoolice, acidul piruvic este decarboxilat în acetaldehidă și CO_2. Reducerea acetaldehidei dă naștere la formarea etanolului. Se pot produce în cantități mici glicerol și acid acetic.

Conversia unei molecule de glucoză în etanol de către drojdii duce la sinteza a două molecule de ATP.

În condiții de anaerobioză, drojdiile nu transformă toată glucoza în etanol și CO_2. Se formează cantități mici de piruvat și NADH + H^+, care sunt folosite pentru menținerea viabilității celulare. Reoxidarea NADH + H^+ este necesară pentru finalizarea fermentației alcoolice. Aceasta se realizează prin intermediul reducerii acetaldehidei, care inițial este absentă. În acest caz, dihidroxiacetonfosfatul joacă rolul de acceptor de hidrogen, reconvertindu-se în fosfo 3-glicerat. La rândul său, acesta se transformă în glicerol.



Această secvență constituie fermentația glicero-piruvică, care are loc totdeauna la începutul fermentației alcoolice. Acetaldehida, care poate fi redusă mai

uşor decât dihidroxiacetonfosfatul, fixează preferenţial hidrogenul la NADH + H^+ şi, îndată ce concentraţia sa este suficientă, începe derularea normală a căii Embden-Meyerhoff-Parnas. Aceasta explică prezenţa constantă a glicerolului în lichidele de fermentaţie.

Teoretic, fermentaţia alcoolică ar trebui să permită obţinerea unui randament de 51,5% din glucoza catabolizată. Totuşi, chiar dacă anaerobioza nu este favorabilă sintezei constituenţilor celulari, se observă o oarecare dezvoltare a microorganismelor corespunzând la aproximativ 2% din glucidele utilizate. Pe de altă parte, rezultă că etanolul şi CO_2 nu sunt singurii metaboliţi formaţi. Pe lângă glicerol se formează şi acizi organici (succinic şi acetic), alcooli superiori, aldehide şi cetone. Totalitatea acestor componente formează 2,7% din glucidul fermentat. Astfel, cantitatea de etanol produsă este în final de maximum 47–48 %, în greutate, faţă de glucidul convertit. Deci, se observă că randamentul de conversie a glucozei în etanol se situează între 91 şi 95% din cel teoretic. Variaţiile pot fi determinate de cantitatea şi calitatea sursei de azot folosite.

În cursul fermentaţiei alcoolice se formează frecvent alcooli superiori, pornind de la dezaminarea aminoacizilor conţinuţi în mediul de fermentaţie (valina → izobutanol, leucina → 3-metil butanol, izoleucina → 2-metil butanol, fenilalanina → 2-fenil etanol) şi de asemenea a acizilor graşi, esterilor, aldehidelor şi cetonelor. Aceşti compuşi conferă savoare şi aromă produselor de fermentaţie.

Trebuie subliniat faptul că o serie de glucide sunt fermentate în etanol de către levuri ca, de exemplu:

- *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, care fermentează zaharoza, fructoza, glucoza, maltoza, maltotrioza;
- *Saccharomyces diastaticus*, care fermentează dextrinele;
- *Saccharomyces uvarum*, care fermentează melibioza;
- *Kluyveromyces*, care fermentează lactoza şi inulina;
- *Candida* – celobioza;
- *Pachysolem*, *Pichia*, *Candida*, care fermentează xiloza.

Fermentaţia homolactică. Acidul lactic este produsul esenţial al acestei fermentaţii (peste 90% din produşii formaţi).

Acidul lactic ia naştere prin reducerea acidului piruvic catalizat de lactat dehidrogenază; poate să fie sub formă D (*Bacillus coagulans*), sub formă L (*B. laevolacticus*) sau DL (*Bacillus racemilacticus*, *Lactobacillus delbrueckii*). Această producţie depinde de stereospecificitatea lactat dehidrogenazei şi de prezenţa sau absenţa racemazei. Microorganismele pot avea doar L-lactatdehidrogenază sau D lactat dehidrogenază sau ambele enzime. Unele tulpini produc acid racemic, deşi posedă lactat dehidrogenază stereospecifică, deoarece racemizarea are loc după formarea acidului lactic optic activ prin intermediul unei racemaze.

Alți producători sunt microorganisme din genurile: *Streptococcus, Pediococcus, Micobacterium, Lactobacillus, Bacillus* și unii fungi (*Phycomycetes*).

Acidul lactic se produce industrial pentru a fi utilizat ca aditiv alimentar.

Fermetațiile homo- și heterolactice intervin, de asemenea, în fabricarea produselor alimentare: brânzeturi, varză murată, saramură de legume, sărătură.

Fermentația heterolactică fungică. Printre fungi, *Rhizopus oryzae* constituie un caz aparte. El produce acid lactic și CO_2 în condiții aerobe și un amestec de acid lactic, etanol și CO_2 în condiții anaerobe. Produșii sunt identici cu cei obținuți în cursul fermentației heterolactice cu *Leuconostoc*, dar mecanismul de formare este diferit: degradarea glucozei se face prin glicoliză. În aerobioză, o parte a piruvatului este transformat în acid lactic, iar cealaltă parte este oxidată. În anaerobioză, o parte a piruvatului este transformată în etanol și CO_2, iar cealaltă parte este transformată în acid lactic. În ambele cazuri acidul lactic este dextrogir.

Fermentația butirică și acetono-butilică. Tulpini din genul *Clostridium* (*C. butyricum, C. perfringens*), *Neisseria și Zymosarcina* produc acid acetic, CO_2 și hidrogen. Acidul butiric se formează prin condensarea a 2 molecule de acetil CoA în acetoacetat, care va fi apoi redus în β-hidroxibutirat și apoi în butirat. O parte din acetil CoA, derivată din piruvat, va forma ATP și acid acetic.

Fermentația propionică. Microorganismele din genul *Propionibacterium*, unele *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, produc prin fermentație acid propionic, acid acetic, CO_2 și uneori acid succinic. Acidul propionic se formează prin reducerea piruvatului (acidul lactic fiind un intermediar), dar el poate fi obținut, de asemenea, prin decarboxilarea acidului succcinic.

Propionibacterium joacă un rol important în tubul digestiv al rumegătoarelor.

Propionibacterium shermanii intervine în fabricarea brânzeturilor.

3.4.2. Fermentații derivate din ciclul Krebs sau șuntul glioxilat

Fermentațiile derivate din ciclul lui Krebs sau șuntul glioxilat sunt fermentații aerobe realizate în principal de fungi. Ele conduc la formarea de acizi organici care sunt metaboliți rezultați direct din ciclul Krebs și șuntul glioxilat sau sunt produși de transformare ai acestora. Produșii se acumulează când ciclul se întrerupe. Această întrerupere poate fi realizată prin variația condițiilor de mediu ca *p*H și prezența inhibitorilor enzimatici, care transformă produsul format. Acumularea poate avea loc și cu ajutorul mutațiilor genelor care controlează aceste enzime.

Punctul de plecare al sintezei acizilor organici din ciclul Krebs este *oxalacetatul*, care este în mod obișnuit reobținut în faza finală a ciclului. Formarea în cantitate mare a acizilor necesită prezența unui aport diferit de acid oxalic, care este format de *ciclurile anaplerotice*.

Oxalacetatul poate fi format:

– din succinat rezultat din şuntul glioxilat: 2 acetat ⟶ 1 succinat;

– prin *carboxilarea piruvatului*, caz în care enzima malică catalizează reacţia de carboxilare ce conduce la malat, care, la rândul său, va fi transformat în oxalacetat prin intermediul dehidrogenazei:

$$\underset{\text{Piruvat}}{CH_3{-}CO{-}COO^-} + CO_2 + NADPH + H^+ \longleftrightarrow \underset{\text{Malat}}{{}^-OOC{-}CH_2{-}CHOH{-}COO^-} + NADP^+$$

$$\underset{\text{Malat}}{{}^-OOC{-}CH_2{-}CHOH{-}COO^-} + NAD^+ \longleftrightarrow \underset{\text{Oxalacetat}}{{}^-OOC{-}CH_2{-}CO{-}COO^-} + NADPH + H^+$$

– prin carboxilarea fosfoenolpiruvatului, precursor al piruvatului:

$$\underset{\text{Fosfoenolpiruvat}}{CH_2 = C(OPO_3^{2-}){-}COO^-} + GDP + CO_2 \longleftrightarrow \underset{\text{Oxalacetat}}{{}^-OOC{-}CH_2{-}CO{-}COO^-} + GTP$$

Acidul citric. Este folosit în industria alimentară şi farmaceutică ca acidifiant, antioxidant, agent chelator. Este produs de tulpini de *Aspergillus niger* sau *A. wentii* prin următoarele procedee:

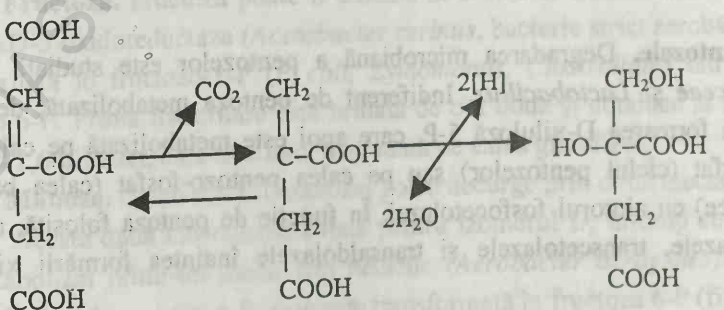
– fermentaţia „Koji", efectuată în Japonia pe tărâţe de grâu umezite;

– fermentaţia în suprafaţă pe medii cu melasă;

– fermentaţia submersă pe medii cu melasă.

Biosinteza acidului citric se realizează fie cu ajutorul mutantelor fie prin modificarea mediului (carenţa indusă de fosfat sau un anumit echilibru în săruri minerale). Fierul este inhibitor, în timp ce cuprul activează biosinteza. În timpul fermentaţiei dispare aconitaza, în timp ce izocitratliaza şi izocitratdehidrogenaza sunt inhibate. În majoritatea cazurilor, fermentaţia are loc în două etape: în prima etapă se formează miceliul, apoi creşterea se opreşte şi are loc acumularea acidului citric.

Acidul itaconic. Este produs de tulpini de *Aspergillus* (*A. itaconicus, A. terreus*). Rezultă din decarboxilarea acidului *cis*-aconitic:



Acid *cis*-aconitic Acid itaconic Acid itatartaric

Această reacție este catalizată de *cis*-aconitat decarboxilaza. Acidul itaconic poate fi descompus în acid itatartaric. Acumularea acidului itaconic are loc dacă condițiile sunt defavorabile acestei transformări; calciul, cuprul, un *p*H scăzut pot bloca enzima care conduce la formarea acidului itatartaric. Acidul itaconic este folosit drept copolimer în sinteza rășinilor acrilice și stirenului.

Acidul fumaric. Este utilizat în industria alimentară și în industria rășinilor poliesterice, fiind biosintetizat de tulpini din genurile *Aspergillus* și *Rhizopus*. Aerația culturilor este esențială pentru acumularea acidului fumaric. În anaerobioză, principalii produși de fermentație sunt etanolul și CO_2. Fermentația glucozei în prezență de $CaCO_3$ conduce la formarea fumaratului de calciu.

Acidul oxalic. Subprodus al fermentației citrice, este produs de diferite tulpini de fungi, în special *Aspergillus niger*. Se obține prin descompunerea acidului oxaloacetic cu oxaloacetat hidrolază.

$$\underset{\text{Acid oxalilacetic}}{HOOC{-}CH_2{-}CO{-}COOH} + H_2O \longrightarrow \underset{\text{Acid acetic}}{HOOC{-}CH_3} + \underset{\text{Acid oxalic}}{HOOC{-}COOH}$$

Acidul *cis*-aconitic. Este produs de *Aspergillus niger*, din citrat.

$$\text{Citrat} \longleftrightarrow \textit{Cis}\text{-aconitat} \longleftrightarrow \text{Izocitrat}$$

Acidul malic. Se obține din acid fumaric cu diferite microorganisme din genurile *Leuconostoc*, *Brevibacterium* etc.

Acidul cetoglutaric sau 2-oxoglutaric. Este produs de *Candida lipolitica* sau *Corynebacterium hydrocarboclastus* cultivate pe parafine sau cu *Pseudomonas fluorescens* cultivat pe glucoză.

Acidul succinic. Poate fi obținut cu *Candida brumptii* cultivată pe parafină.

3.4.3. Degradarea microbiană a altor glucide (decât glucoza)

Pentozele. Degradarea microbiană a pentozelor este studiată la *Enterobacteriaceae* și *Lactobacillus*. Indiferent de pentoza metabolizată, degradarea conduce la formarea D-xiluloză 5-P, care apoi este metabolizată pe calea hexozomonofosfat (ciclul pentozelor) sau pe calea pentozo-fosfat (calea bacteriilor heterolactice) cu ajutorul fosfocetolazei. În funcție de pentoza folosită, acționează izomerazele, transcetolazele și transaldolazele înaintea formării xilulozo-P (fig. 3.18).

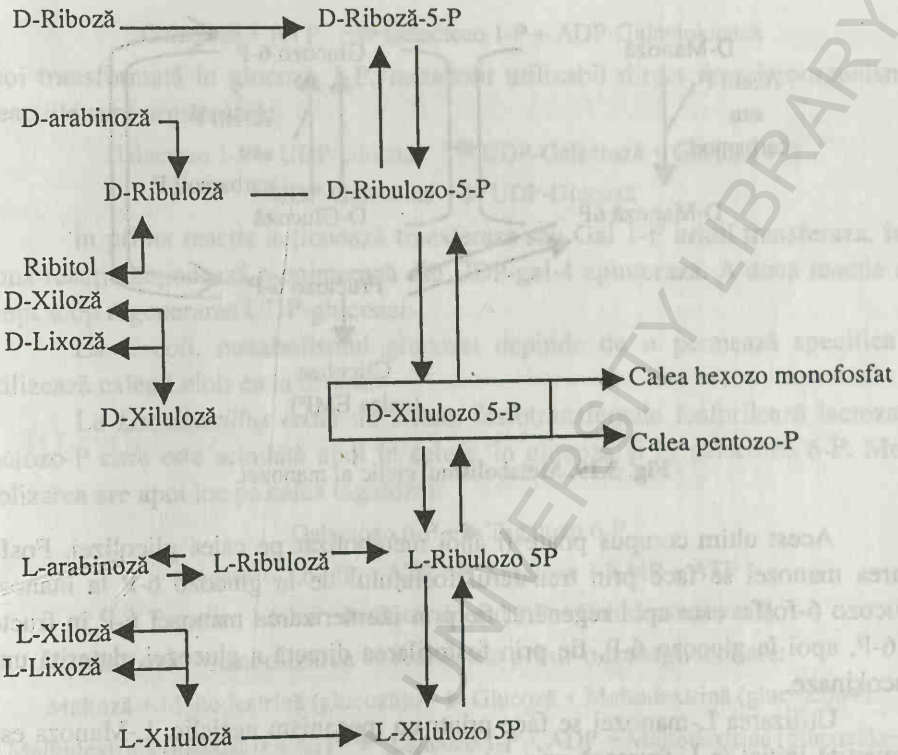


Fig. 3.18. Schema generală a metabolismului pentozelor.

La bacterii asimilarea xilulozei se realizează cu ajutorul unei izomeraze:

Xiloză → Xiluloză

în timp ce la drojdii intervine o etapă intermediară:

Xiloză → Xilitol → Xiluloză

Fructoza. Fructoza poate fi oxidată în 5 ceto-D-fructoză de către D-fructoza-NAD-5 oxidoreductaza (*Acetobacter cerinus*, bacterie strict aerobă), sau poate fi fosforilată în fructozo-1-P (*E. coli, Zymomonas, Clostridium*) sau mai rar în fructozo 6-P. Prima fosforilare este urmată de o a doua şi conduce la formarea de fructozo 1,6-bifosfat, care este apoi degradată pe calea glicolizei.

Manoza. Catabolismul manozei poate decurge prin două mecanisme foarte diferite. Aceste două mecanisme există pentru izomerul D, în timp ce izomerul L este catabolizat printr-un mecanism neciclic (*Aerobacter aerogenes*). D-Manoza este fosforilată în manoza 6-P, care este transformată în fructoza 6-P (fig. 3.19).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

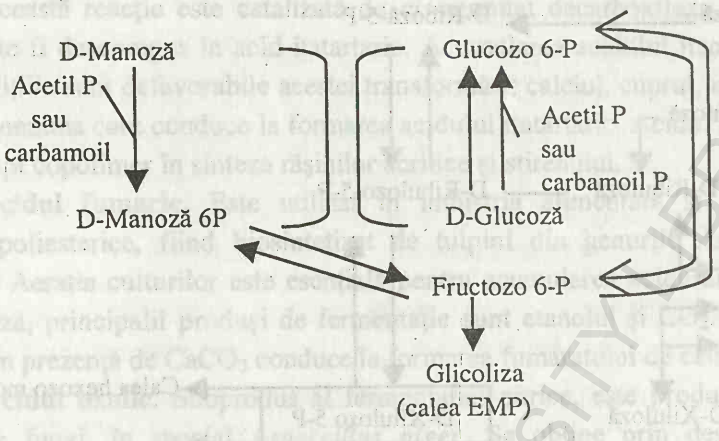


Fig. 3.19. Metabolismul ciclic al manozei.

Acest ultim compus poate fi apoi metabolizat pe calea glicolizei. Fosforilarea manozei se face prin transferul fosfatului de la glucozo 6-P la manoză. Glucozo 6-fosfat este apoi regenerat fie prin izomerizarea manozei 6-P în fructozo 6-P, apoi în glucozo 6-P, fie prin fosforilarea directă a glucozei, datorită unei glucokinaze.

Utilizarea L-manozei se face printr-un mecanism neciclic. L-Manoza este convertită inițial în L-fructoză prin intermediul unei izomeraze. Apoi are loc fosforilarea fructozei în fructozo 1-fosfat, care va fi scindată în dihidroxiacetonfosfat și în L-gliceraldehidă, a cărei metabolizare se efectuează pe calea glicolizei.

În prima fază a catabolismului intervine invertaza. Această enzimă care hidrolizează zaharoza în glucoză și fructoză este prezentă la numeroase tulpini de drojdii (*Candida utilis, Saccharomyces cerevisiae*), fungi (*Aspergillus niger, Penicillium chrysogenum*) și la diferite bacterii (*Clostridium pasteurianum, Streptococcus*). După clivarea moleculei de zaharoză, glucoza și fructoza sunt degradate prin căile descrise anterior.

Zaharoza este hidrolizată la exteriorul celulelor de drojdii și fungi, în timp ce la bacterii (bacterii lactice, *Bacillus subtilis*) zaharoza este transportată în interiorul celulelor sub formă de zaharozo-P, apoi este hidrolizată:

$$\text{Zaharozo-P} \longrightarrow \text{Glucozo 6-P} + \text{Fructoză}$$

Lactoza și galactoza. Multe microorganisme posedă β-galactozidază. Astfel, dintre levuri, buni producători de β-galactozidază sunt: *Kluyveromyces lactis, K. fragilis, Candida pseudotropicalis* etc; dintre fungi: *Aspergillus niger, A. oryzae* etc.; dintre bacterii: *E. coli, Bacillus stearothermophilus, Lactobaccillus bulgaricus* etc. După hidroliză, glucoza este degradată prin una din căile descrise deja. În ceea ce privește galactoza, ea este degradată în special la drojdii pe calea Leloir-Kalchar. La început este fosforilată:

Galactoză + ATP → Galactozo 1-P + ADP-Galactokinază

apoi transformată în glucozo 1-P, metabolit utilizabil direct de microorganisme. Reacțiile sunt următoarele:

Galactozo 1-P + UDP-Glucoză → UDP-Galactoză + Glucozo 1-P

UDP-Galactoză → UDP-Glucoză

În prima reacție acționează transferaza sau Gal 1-P uridil transferaza, în a doua reacție acționează o epimerază sau UDP-gal-4 epimeraza. A doua reacție are drept scop regenerarea UDP-glucozei.

La *E. coli*, metabolismul glucozei depinde de o permează specifică și utilizează calea Leloir ca la drojdii.

La *Lactobacillus casei* un sistem fosfotransferazic fosforilează lactoza în lactozo-P care este scindată apoi în celule, în glucoză și în galactozo 6-P. Metabolizarea are apoi loc pe calea tagatozei:

Galactozo 6-P → Tagatozo 6-P

Tagatozo 1,6-biP + ATP → Tagatozo 1,6-biP + ATP

Tagatozo 1,6-biP → Gliceraldehid 3-P + Dehidroxiaceton-P

Maltoza. Metabolizarea se realizează printr-o transglicozilare:

Maltoză + Maltodextrină (glucoză)$_n$ → Glucoză + Maltodextrină (glucoză)$_{n+1}$

Maltodextrină (glucoză)$_x$ + ATP → (Fosfoamilază) Glucozo 1-P + ADP + Maltodextrină (glucoză)$_{x-1}$

Glucozo 1-P → (Fosfoglucomutază) Glucozo 6-P

Metabolizarea în continuare are loc pe căile descrise.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. CINETICA PROCESELOR DE BIOSINTEZĂ

4.1. DINAMICA MULTIPLICĂRII BACTERIILOR. CURBA DE CREŞTERE

Procesul de creştere a microorganismelor se desfăşoară prin sinteza specifică echilibrată a constituenţilor celulari, pornind de la substanţe nutritive simple aflate în mediul de cultură [Gh. Zarnea].

Procesul de creştere a microorganismelor este controlat genetic. Pe de altă parte, acesta depinde în evoluţia sa şi de natura şi concentraţia substanţelor nutritive în mediu, precum şi de asigurarea cu energia necesară reacţiilor de sinteză. Creşterea bacteriilor se realizează prin depunerea uni- sau tridimensională de substanţă nouă, ceea ce determină mărirea celulei bacteriene în sensul uneia dintre dimensiunile ei sau în sensul celor trei dimensiuni. Mărirea volumului celular se face atât prin sinteza de substanţă organică cât şi prin mărirea conţinutului în apă. Creşterea microorganismelor nu are loc indefinit, ci se întrerupe la un moment dat, când se produce diviziunea celulară.

Activitatea normală a microorganismelor este condiţionată de existenţa unui anumit raport între volumul celulei şi suprafaţa ei, prin care se face absorbţia substanţei nutritive şi eliminarea cataboliţilor. În cursul creşterii celulei, raportul suprafaţă/volum se modifică datorită faptului că, în timp ce suprafaţa creşte cu o relaţie pătratică, volumul ei se modifică cu o relaţie cubică, ceea ce determină o diminuare relativă a suprafeţei celulare, fapt ce îngreunează schimbul de substanţe şi, atunci când disproporţia dintre suprafaţă şi volum atinge un anumit punct critic, se produce diviziunea celulară.

În cadrul proceselor biotehnologice, studiul creşterii şi multiplicării microorganismelor producătoare are o importanţă deosebită pentru eficienţa tehnologiilor industriale. Spre deosebire de organismele pluricelulare, la care multiplicarea celulelor duce la mărirea taliei individuale, la toate celelalte organisme unicelulare, ea are ca rezultat creşterea numărului de indivizi. Viteza de multiplicare a

bacteriilor este excepţional de mare. Durata unei generaţii – interval de timp dintre două diviziuni succesive – este tipică pentru fiecare specie, dar poate varia la aceeaşi specie în funcţie de condiţiile de mediu, fiind, în general, cuprinsă între 20 şi 30 de minute.

Procesul multiplicării populaţiilor bacteriene este bine cunoscut. Acesta cuprinde mai multe faze (fig. 4.1), care sunt descrise în continuare.

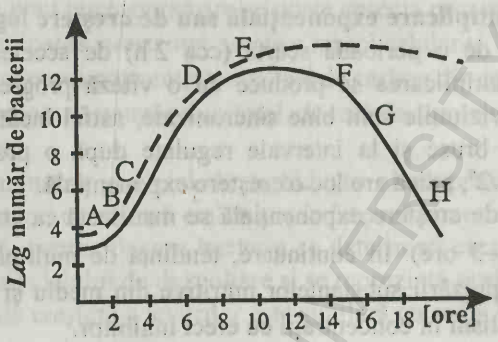


Fig. 4.1. Curba de creştere a unei populaţii bacteriene [Gh. Zarnea]:
A – însămânţare; *A-B* – faza de *lag*; *B-C* – faza de accelerare a ritmului de creştere; *C-D* – faza de multiplicare logaritmică; *D-E* – faze de încetinire a ritmului de creştere; *E-F* – faza staţionară; *F-G* – faza intermediară de declin; *G-H* – faza de declin;
—— număr de celule viabile (UFC – unităţi formatoare de colonii);
– – – număr total de celule din mediul de cultură.

Faza de latenţă sau *lag*. Este cuprinsă între momentul introducerii microorganismului în mediul de cultură (inoculare) şi momentul în care celulele acestuia încep să se multiplice. În această fază, numărul bacteriilor din inocul rămâne neschimbat sau chiar scade temporar. Cultura nu este vizibilă macroscopic. Această fază durează în medie câteva ore. Faza de latenţă apare ca o perioadă de adaptare în noile condiţii de cultivare. În această perioadă bacteriile viabile din inocul îşi acumulează în celulă metaboliţii esenţiali şi sistemele enzimatice necesare creşterii.

La transvazarea inoculului într-un mediu nutritiv, se întâlnesc, în principal, două situaţii:

– dacă inoculul bacterian provine dintr-o cultură aflată în curs de multiplicare şi se transvazează într-un mediu nutritiv cu aceeaşi compoziţie, multiplicarea bacteriilor îşi menţine în continuare ritmul rapid (este cazul transvazării inoculului în intermediar, operaţie efectuată numai pentru obţinerea de cantităţi mai mari de inocul necesare fazei următoare de biosinteză numită: fază de regim;

– dacă bacteriile provin dintr-o cultură tot în fază exponențială de multiplicare dar se transvazează un mediu nutritiv cu altă compoziție, atunci ele au o perioadă de adaptare, creșterea lor nefiind evidențiată de la început.

Durata perioadei de latență variază, deci, în funcție de noile condiții de mediu pe care microorganismele le găsesc la transvazare. Cu cât aceste condiții noi (mediu nutritiv, temperatură, *p*H, aerație) sunt mai apropiate de cele anterioare, cu atât perioada de *lag* este mai scurtă.

Faza de multiplicare exponențială sau de creștere logaritmică. Această fază este precedată de o perioadă scurtă (cca 2 h) de accelerare a ritmului de creștere, în care multiplicarea se produce cu o viteză progresivă mărită. După această perioadă, diviziunile sunt bine sincronizate, astfel încât numărul celulelor viabile se dublează brusc și la intervale regulate după o progresie geometrică $2, 2^0, 2^1, 2^2, 2^3 \ldots\ldots 2^n$, adică are loc o creștere exponențială.

Capacitatea de creștere exponențială se manifestă ca atare numai o scurtă perioadă de timp (2–3 ore). În continuare, tendința de multiplicare rapidă scade progresiv, datorită epuizării substanțelor nutritive din mediu și acumulării în el a produselor de catabolism în concentrații cu efect inhibitor.

În faza de multiplicare exponențială, celulele considerate a fi de tip embrionar au dimensiuni mai mari decât cele specifice speciei de care aparțin, citoplasma lor este omogenă, nu conține materiale de rezervă și are o mare afinitate pentru coloranții bazici, datorită conținutului ridicat în ARN. Întrucât această perioadă corespunde unor transformări permanente, celulele aflate în faze exponențiale de multiplicare sunt cele mai potrivite pentru lucrări de genetică efectuate în scopul obținerii de noi tulpini producătoare.

Spre sfârșitul fazei de multiplicare logaritmică apare o așa-numită perioadă de post-*lag*, în care are loc un fenomen de încetinire și de sincronizare a creșterii populației bacteriene, celulele aflându-se în stadii diferite ale ciclului lor de dezvoltare. În această perioadă cultura tinde spre un echilibru între diviziune și mortalitate. Din această fază sunt amorsate biosintezele în culturi continue.

Faza staționară maximală. Este faza în care numărul celulelor viabile este maxim și rămâne constant o perioadă de timp care durează de la câteva ore, la câteva zile, în funcție de sensibilitatea bacteriilor la condițiile de mediu.

Intrarea culturii în faza staționară este determinată, de obicei, de epuizarea substanțelor nutritive din mediu sau de acumularea unor produși toxici. În această fază, celulele nu se mai multiplică, iar numărul total al indivizilor populației este constant și egal cu numărul celulelor viabile. În această fază celulele bacteriene sunt considerate mature, având caracteristici morfologice specifice speciei: dimensiuni mai mici decât în faza de creștere exponențială, citoplasma mai puțin omogenă datorită apariției de incluzii și acumulării unor substanțe de rezervă, afinitate normală pentru coloranți și prezența sporilor la speciile sporogene.

Faza de declin. Este faza corespunzătoare unei scăderi progresive a numărului celulelor viabile datorită morții unui număr foarte mare de celule. Celulele din această fază sunt bătrâne, apărând fenomene de involuție: celulele mici, sferice, deformate, gigante sau ramificate, care se colorează slab sau capătă afinitate față de coloranții acizi, iar la speciile sporogene apar foarte mulți spori. În unele cazuri se produc fenomene de autoliză, ceea ce determină scăderea numărului total de celule din mediu.

Creşterea unui microorganism se poate aprecia prin mai multe metode:

- determinarea substanței uscate a masei celulare;
- determinarea concentrației sursei de carbon din mediu;
- determinarea numărului total de celule, cu ajutorul celulei microscopice de numărat;
- determinarea gradului de turbiditate al suspensiei bacteriene într-un mediu lichid, în raport cu o scară etalon sau la fotocolorimetru (D.O.).

De regulă, pentru fiecare bacterie se determină creşterea densității optice (D.O.) pe parcursul ciclului de dezvoltare şi se reprezintă grafic în funcție de timp.

Cinetica de creştere a levurilor este similară cu cea a bacteriilor.

4.1.1. Dinamica procesului de creştere la fungi

Spre deosebire de bacterii şi drojdii, fungii cresc sub formă de colonii, deoarece singurele celule individuale la aceste microorganisme sunt conidiile.

În cazul fungilor, se dezvoltă un miceliu ramificat a cărui lungime poate atinge 10–15 m.

Creşterea unui miceliu pornind de la un inocul de spori sau de la un fragment micelian parcurge mai multe faze:

- *faza inițială de lag*, care durează câteva ore. În această fază are loc germinarea sporilor (când inocularea s-a efectuat cu suspensie de spori) sau regenerarea hifelor rupte şi lezate (când inocularea s-a efectuat cu inocul vegetativ);
- *faza de creştere liniară*, în care pe suprafața mediului apare o colonie circulară, care creşte liniar cu timpul. Ea are forma unei rețele fine de hife ale cărei mărime şi grosime depind de compoziția mediului nutritiv;
- *faza de învechire*, care corespunde încetinirii vitezei de creştere determinată de efectul dăunător al produşilor de metabolism eliberați de colonie.

Încetinirea ritmului de creştere apare mai repede când cultura se dezvoltă pe medii bogate în substanțe nutritive, datorită acumulării mai rapide a produşilor de metabolism.

Creşterea coloniilor de mucegai se poate efectua pe medii solide sau lichide în culturi de suprafață sau submerse.

Pe medii lichide, în culturi statice, fungii produc o „pânză" micelian la suprafața lichidului. În acest caz, diferitele părți ale culturii se găsesc în condiții diferite de mediu şi capacitatea de biosinteză a unui produs este diminuată.

De aceea, în procesele biotehnologice industriale în care este necesară o dezvoltare abundentă şi egală a mucegaiului se utilizează cultivarea submersă, cu agitare mecanică şi aerare corespunzătoare.

4.2. INFLUENŢA FACTORILOR DE MEDIU ASUPRA CREŞTERII MICROORGANISMELOR

Creşterea microorganismelor este influenţată de o serie de factori de mediu, dintre care cei mai importanţi sunt:

- concentraţia substratului;
- calitatea şi cantitatea inoculului;
- temperatura;
- *p*H-ul mediului de biosinteză;
- agitarea;
- concentraţia oxigenului dizolvat.

4.2.1. Influenţa concentraţiei substratului asupra procesului de biosinteză

Celula microbiană, datorită volumului ei redus, este extrem de sensibilă la variaţiile locale ale parametrilor procesului de biosinteză, în special la variaţiile concentraţiei de substrat. Mărirea concentraţiei de substrat în mediul de cultură poate conduce la sporirea numărului de celule microbiene, dar numai până la anumite limite, multiplicarea acestora fiind încetinită de procese de inhibiţie care au loc la nivelul celulei.

Acţiunea unui inhibitor asupra celulei microbiene se poate exercita prin:

- modificarea potenţialului chimic al substratului, intermediarilor metabolici sau a produsului finit;
- modificarea permeabilităţii peretelui celular şi reducerea transportului substanţelor nutritive;
- modificarea activităţii enzimelor implicate în procesul metabolic;
- disocierea agregatelor metabolice;
- modificarea parametrilor funcţionali ai celulei microbiene (capacitatea de multiplicare, mobilitatea, biosinteza unor metaboliţi).

Mecanismele prin care se realizează inhibiţia sunt:

- reacţie chimică cu una sau mai multe componente celulare;
- adsorbţia sau complexarea unor enzime sau coenzime;

– intervenția în secvențe a reacțiilor biochimice;
– intervenția în disocierea complexelor enzimatice;
– modificarea parametrilor fizico-chimici ai mediului de biosinteză (*p*H, tărie ionică, constantă dielectrică, capacitate de solvatare);
– intervenția în funcțiile celulare de control.

Datorită acestor fenomene, concentrații mari de substrat inhibă dezvoltarea microorganismelor într-un anumit grad ajungând chiar la inhibiție totală. Din acest motiv, pentru un sistem de biosinteză se stabilește concentrația optimă a substratului atât în momentul inițial cât și pe parcurs. De exemplu, pentru foarte multe bacterii, concentrația de 10–15% în sursă de carbon (glucoză, zaharoză) este inhibitoare, ele dezvoltându-se bine la valori ale sursei de carbon sub 10%.

Acesta este motivul pentru care în soluții foarte concentrate de zahăr (de exemplu dulcețuri, siropuri) microorganismele, în general, nu se dezvoltă, acestea putând fi conservate pe o lungă perioadă de timp.

4.2.2. Influența dimensiunii inoculului

Calitatea și cantitatea inoculului joacă un rol important pentru obținerea unor metaboliți cu randamente dorite de biosinteză. Cel mai adesea se utilizează o cantitate mare de inocul pentru a determina o declanșare rapidă a dezvoltării culturii, concomitent cu reducerea riscului de contaminare.

În majoritatea cazurilor este necesar ca inoculul să se situeze între 3 și 10% din volumul total al culturii.

Pentru fiecare tehnologie în parte se stabilește așa-numitul „raport optim de inoculare", care definește cantitățile optime de inocul.

Pentru asigurarea unei productivități bune și pentru măsurarea densității inoculului, se extrag probe din cultura aflată într-un anumit stadiu de evoluție optim pentru obținerea unei producții maxime a metabolitului dorit și se determină parametrii specifici (numărul de germeni pe unitatea de volum, sau conținutul în biomasă uscată raportată la unitatea de volum).

Efectele determinate de cantitatea și vârsta inoculului sunt specifice pentru diferite microorganisme.

La **bacterii**, când se utilizează o cantitate mare de inocul, se micșorează faza de *lag*. Aceasta se datorează formării și acumulării unor metaboliți intermediari esențiali care pot difuza în celule și în mediul de cultură mai rapid decât în cazul utilizării unui inocul mic. Uneori, însă, cantități mari de inocul determină apariția unui fenomen de autoinhibiție, datorat sensibilității celulelor bacteriene față de unii produși metabolici intermediari.

Când cantitatea de inocul este însă prea mică, faza de *lag* poate fi prelungită la infinit şi aceasta nu poate conduce la o dezvoltare normală a culturii de microorganisme. S-a observat că în cazul bacteriilor, pentru iniţierea dezvoltării unui inocul, este necesară prezenţa în mediul de cultură a unei concentraţii critice de metale grele. De exemplu, pentru un inocul de *Bacillus subtilis* este necesară prezenţa în mediul de cultură a unei concentraţii minime de mangan, în vederea iniţierii dezvoltării. Aceste cercetări subliniază importanţa ionilor metalelor grele pentru faza de *lag* la bacterii.

Cantitatea de inocul la bacterii are influenţă mare asupra stadiilor ulterioare ale culturii, determinând diferite stări fiziologice ale celulelor în funcţie de care variază capacitatea de biosinteză a metabolitului dorit.

În cazul **levurilor**, cantitatea de inocul poate influenţa, de asemenea, durata fazei de *lag* sau stadiile ulterioare de dezvoltare, similar cu cele descrise în cazul bacteriilor.

În cazul **fungilor**, importanţa standardizării inoculului vegetativ pentru acest grup de microorganisme este hotărâtoare. Astfel, pentru obţinerea unui ritm rapid de dezvoltare este necesar să se utilizeze un inocul sub formă de suspensie de spori. De asemenea, poate să apară fenomenul de autoinhibiţie sau autostimulare a germinării sporilor, datorită prezenţei unor substanţe produse în timpul germinării sau în fazele ulterioare. Astfel că, în cazul fungilor, cantitatea de inocul influenţează mărimea şi forma miceliului precum şi randamentul în metaboliţi.

Raportul de inoculare trebuie să fie stabilit astfel încât cantitatea de miceliu dezvoltat ulterior să nu fie prea mare în *detrimentul* secreţiei metabolitului dorit. O dezvoltare abundentă a masei miceliene conduce în acelaşi timp la un consum mare de sursă de carbon, cultura fiind astfel ineficientă.

4.2.3. Efectul temperaturii asupra creşterii microorganismelor

Temperatura mediului în care are loc procesul de biosinteză este un factor extrem de important pentru activitatea microorganismelor. Temperatura este un factor care acţionează în mod direct asupra microorganismelor vii; diferenţa între temperatura mediului înconjurător şi cea din interiorul celulei trebuie să fie nulă. Pentru un proces de biosinteză industrial, temperatura poate fi considerată unul dintre parametrii fizici cei mai importanţi, care este implicat profund, prin efectele sale, în optimizarea procesului.

Variaţiile temperaturii au efect asupra randamentului de transformare a substratului în produsul dorit, asupra cerinţelor nutritive ale microorganismului şi compoziţiei biomasei obţinute precum şi asupra vitezei de creştere microbiană.

În funcţie de domeniul de temperatură în care microorganismele ating viteza maximă de creştere, acestea se clasifică în: criofile, mezofile şi termofile

(fig. 4.2). Se observă că fiecare grup de microorganisme are un domeniu de cca 10°C în care viteza de creştere este maximă. Microorganismele industriale sunt, în general, mezofile, astfel încât acest domeniu este plasat în intervalul 25...35°C.

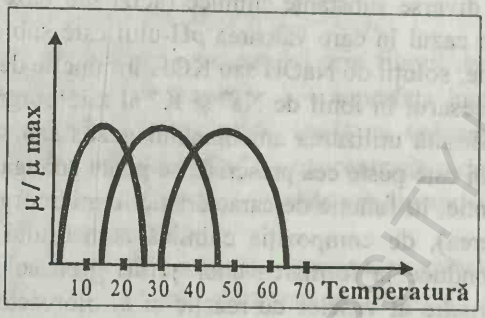


Fig. 4.2. Influenţa temperaturii asupra creşterii microorganismelor (Cooney, 1981).

Efectul temperaturii asupra creşterii microorganismelor se explică prin faptul că aceasta afectează multe procese metabolice din celulă, precum şi compoziţia biomasei în proteine şi lipide, conţinutul în ARN al celulei. Este posibil ca structura lipidică a membranei celulare să se modifice continuu în funcţie de variaţiile de temperatură, astfel încât membrana să-şi menţină funcţia reglatoare.

4.2.4. Efectul *p*H-ului asupra creşterii microorganismelor

Valoarea *p*H-ului este, alături de temperatură, un parametru important în procesele de biosinteză. Influenţa valorii *p*H-ului asupra dezvoltării culturilor microbiene se poate urmări în câteva direcţii:

– în general, microorganismele au un domeniu optim de *p*H pentru dezvoltare, în care viteza specifică de creştere atinge valoarea maximă. De exemplu, pentru anumite specii de drojdii domeniul optim de *p*H se situează între valorile 4 şi 5. Există însă şi specii de drojdii care cresc la valori de *p*H în jur de 2 sau, dimpotrivă, la valori ridicate ale *p*H-ului în jur de 8 (de exemplu, biosinteza fenilalaninei cu o drojdie din genul *Rhodotorula*). Cultivările de microorganisme care decurg la valori ale *p*H-ului mai scăzute (*p*H = 3–4) prezintă avantajul unui risc mai scăzut de contaminare, ceea ce este apreciat în mod deosebit în cazul unei cultivări industriale;

– efectul valorii *p*H-ului asupra randamentului de conversie a substratului la un anumit produs. Formarea produsului dorit în urma procesului de biosinteză poate să fie legată de desfăşurarea bioprocesului într-un domeniu foarte strict de *p*H. În timpul dezvoltării unei culturi microbiene apar deviaţii ale *p*H-ului

de la valoarea considerată optimă, care pot avea urmări nedorite asupra procesului de biosinteză. Aceste modificări se pot datora fie consumării unui nutrient (consumarea sursei de carbon sau consumarea sursei de azot), fie producerii unui acid organic de către microorganism. Pentru corectarea *p*H-ului la valoarea prescrisă se adaugă diverse substanțe chimice (acizi sau baze) alese în funcție de mai mulți factori; în cazul în care valoarea *p*H-ului este sub cea prescrisă, se pot folosi, pentru corecție, soluții de NaOH sau KOH în funcție de compoziția chimică a mediului și de necesarul în ionii de Na^+ și K^+ al microorganismului; în același scop este mult răspândită utilizarea amoniacului gazos sau soluție. În situația în care valoarea *p*H-ului este peste cea prescrisă, se poate adăuga acid clorhidric, acid sulfuric sau acid azotic, în funcție de caracteristicile microorganismului (ionul Cl^- să nu inhibe creșterea), de compoziția chimică a mediului (adăugarea de acid sulfuric ar putea conduce la formarea unor săruri greu solubile), precum și de materialul de construcție al vaselor de reacție și al bioreactoarelor (probleme de coroziune);

– prin efectul de disociere a acizilor și bazelor, *p*H-ul acționează asupra caracteristicilor suprafeței celulei, modificând proprietățile ei de aderare la diferite materiale (sticlă, metale) precum și cele de floculare.

4.2.5. Concentrația de oxigen dizolvat

În culturile aerobe, este esențial să se realizeze dizolvarea în mediu a întregii cantități de oxigen necesare microorganismului în orice moment al fermentației, prevăzându-se în general un oarecare exces față de nevoi. De aceea, se urmărește în general obținerea unor aerații cât mai eficiente, transferul de oxigen din faza gazoasă în faza lichidă (mediul de fermentație) având loc cu viteze mari.

În cazul în care procesul de biosinteză se desfășoară în laborator la flacoane agitate, aerația depinde de următorii parametri:

– viteza de rotație sau translație a agitatorului;
– mărimea flacoanelor Erlenmeyer;
– volumul de mediu de cultură din flacon;
– creșterea turbulenței prin șicane.

Eficiența aerării unui mediu de cultură este reflectată de concentrația de oxigen dizolvat. Există mai multe metode de determinare a eficienței aerației :

– *metoda sulfit*, care permite măsurarea vitezei maxime de transfer a oxigenului din aer în mediu;
– *metoda polarografică* de determinare a concentrației oxigenului dizolvat în mediu;
– *utilizarea electrodului cu membrană* pentru măsurarea concentrației de O_2 dizolvat și a consumului de O_2;
– *utilizarea analizorului paramagnetic* de O_2, care analizează compoziția aerului la ieșirea din bioreactor și o compară cu compoziția celui care intră.

Pentru evaluarea cineticii transferului de O_2 se utilizează de cele mai multe ori prima metodă bazată pe oxidarea practic instantanee a sulfitului de sodiu catalizată de metale grele în prezența oxigenului dizolvat; în acest mod s-a stabilit ecuația:

$$v = K_L \times a\,(C_a - C_L),$$

în care: v este viteza de transfer a oxigenului prin filmul de lichid de la suprafața bulei; K_L – coeficient global de transfer; a – suprafața interfacială gaz – lichid; C_a – concentrația oxigenului la suprafață, egală cu valoarea de saturație pentru sistemul aer – apă, la temperatura dată; C_L – concentrația oxigenului în apă.

Pentru sistemele intens aerate, valorile produsului „$K_L \cdot a$" sunt cuprinse între 70 și 400 mM O_2 absorbit/l oră.

În cazul reactoarelor de biosinteză, aerarea se aplică unui sistem deosebit de complex, conținând numeroase substanțe dizolvate și având o concentrație ridicată de microorganisme suspendate. Alegerea parametrilor sistemului de aerare este determinată de necesitatea furnizării unei cantități de oxigen suficientă pentru a asigura o valoare maximă a activității metabolice în reactoarele de biosinteză; în acest caz, un anumit microorganism și un anumit mediu de cultură se caracterizează printr-o rată de utilizare a oxigenului specifică.

Pentru conducerea unui proces este esențială cunoașterea exactă a modului de variație în timp a necesarului de oxigen și a ratei consumului de oxigen.

Rata consumului de oxigen sporește rapid până la o valoare maximă încă din primele stadii ale procesului de biosinteză, scăzând apoi (fig. 4.3). Valoarea maximă a ratei de consum a oxigenului (O_2) coincide, de obicei, cu momentul atingerii concentrațiilor ridicate de celule la microorganisme. Necesarul de oxigen al culturii este influențat de mediul de biosinteză utilizat. De exemplu, datorită vitezei mari de utilizare a monozaharidelor față de dizaharide, de către *Penicillium*, necesarul de oxigen este dublu la utilizarea glucozei ca sursă de carbon față de zaharoză.

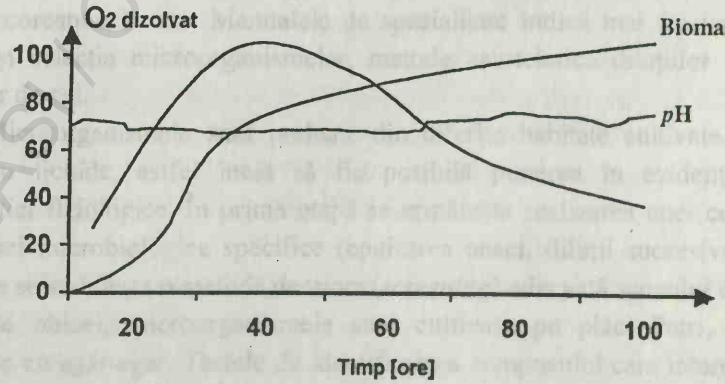


Fig. 4.3. Modificarea concentrației de O_2, *p*H-ul și concentrația de biomasă celulară pentru *Mycothecium verrucaria.*

Alți factori care influențează transferul de O_2 sunt:

– prezența în mediul de cultură a agenților tensioactivi, care determină o micşorare a coeficienților de transfer;

– concentrația de microorganisme: la concentrații ridicate de microorganisme, vâscozitatea mediului creşte, iar eficiența sistemului de aerare scade, bulele tinzând să circule prin canale preferențiale, cu rezistență redusă la înaintare;

– sistemul de agitare al bioreactorului, care influențează sensibil concentrația oxigenului dizolvat, o agitare eficientă a mediului de cultură conducând la o dispersie corespunzătoare a bulelor de aer şi, deci, la mărirea coeficientului de transfer al oxigenului;

– echipamentul de aerare utilizat, care permite obținerea unei dispersii uniforme a bulelor de aer: conductele perforate constituie echipamentul preferat pentru reactoarele de biosinteză, de volum mare;

– suprapresiunea, care favorizează mărirea concentrației de oxigen în mediul de cultură, în general procesele biotehnologice fiind conduse la suprapresiuni cuprinse între 0,5 şi 1 bar (în scopul micşorării riscului de infecție).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. ETAPELE UNUI PROCES BIOTEHNOLOGIC

Elaborarea şi industrializarea unei tehnologii de biosinteză presupune parcurgerea mai multor faze constând în cercetări la nivel de: laborator, pilot şi industrial. Aceste cercetări permit transpunerea procedeului de biosinteză de la o fază la alta.

5.1. FAZA DE LABORATOR

Cercetările de obţinere a unui produs prin biosinteză încep cu lucrări de laborator care sunt prezentate în cele ce urmează.

Izolarea şi selecţia. Se izolează şi se selectează un mare număr de microorganisme cunoscute din literatura de specialitate ca producători ai compusului ce urmează a fi biosintetizat. Tehnicile utilizate în acest scop sunt specifice pentru fiecare microorganism şi sunt realizate de microbiologi cu pregătire corespunzătoare. Manualele de specialitate indică mai frecvent, pentru izolarea şi selecţia microorganismelor, metode ca: tehnica diluţiilor şi tehnica granulelor de sol.

Microorganismele sunt preluate din diferite habitate cultivate pe medii solide sau lichide, astfel încât să fie posibilă punerea în evidenţă a unor caracteristici fiziologice. În prima etapă se urmăreşte realizarea unei culturi pure prin tehnici microbiologice specifice (epuizarea ansei, diluţii succesive etc.). În continuare se stabileşte o metodă de triere (*screening*) adecvată scopului urmărit.

De obicei, microorganismele sunt cultivate pe plăci Petri, pe medii solidificate cu agar-agar. Testele de identificare a compusului care interesează pot fi calitative sau cantitative. În cazul enzimelor, de exemplu, se aplică, de obicei, metode de identificare calitativă prin includerea în mediul solid, pe care se cultivă

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

microorganismele, a substratului specific asupra căruia acţionează enzima ce se doreşte a se sintetiza (amidon în cazul amilazelor, cazeină în cazul proteazelor, celuloză în cazul celulazelor). După dezvoltarea coloniilor izolate, enzimele difuzează în gelul de agar-agar, atacând substratul inclus în mediu şi, astfel, zona respectivă poate fi vizualizată, în cazul în care devine transparentă sau cu un reactiv specific.

În cazul altor enzime la care nu se poate aplica un test calitativ, coloniile izolate se cultivă pe medii specifice, iar extractul sau lichidul de biosinteză este preluat şi prelucrat în scopul dozării cantitative a acesteia prin metode spectrofotometrice, fluorescenţă, titrimetrice, polarimetrice. În urma acestor teste se reţin numai câteva tulpini care au dat cele mai bune rezultate în ceea ce priveşte biosinteza enzimei.

Întreţinerea tulpinilor producătoare. După faza de izolare şi selecţie, tulpinile producătoare se supun unor lucrări de caracterizare după criterii morfologice, biochimice, fiziologice, imunologice, toxicologice. Tulpina astfel caracterizată se înregistrează într-o colecţie de microorganisme sub un număr de identificare. De obicei, aceste tulpini sunt supuse unor lucrări de selecţie naturală şi artificială (mutageneză) în scopul obţinerii de tulpini mutante înalt producătoare.

Atât tulpinile parentale cât şi tulpinile mutante sunt conservate prin metode speciale şi păstrate la temperaturi scăzute. Dintre metodele de conservare amintim: liofilizarea şi conservarea în azot lichid.

Tulpinile din colecţie utilizate în lucrările de biosinteză curente se păstrează sub diferite forme, după metode de întreţinere a culturilor, specifice fiecărui microorganism şi formează aşa-numita „cultură stoc" de la care se porneşte procesul de biosinteză.

De obicei, cultura stoc este păstrată la frigider, pe geloză nutritivă, în tub înclinat. Pentru prepararea unei culturi inocul de laborator, se porneşte de la o astfel de cultură vegetativă.

Cultura de inocul. Inoculul reprezintă o cultură microbiană în curs de multiplicare pe un substrat nutritiv corespunzător şi în anumite condiţii specifice de dezvoltare (*p*H, temperatură, agitare, aerare).

Inoculul constituie materialul de însămânţare al mediului de biosinteză propriu-zis, din etapa următoare.

Transvazarea culturii inocul în mediul de biosinteză se realizează în condiţii aseptice, după o perioadă de dezvoltare bine stabilită de către microbiolog (vârstă, cantitate, aspect microscopic). În figura 5.1 poate fi urmărită o instalaţie de laborator (*shake-flask cultures*) pentru producerea de enzime existente în cadrul Facultăţii de Biotehnologii, Bucureşti.

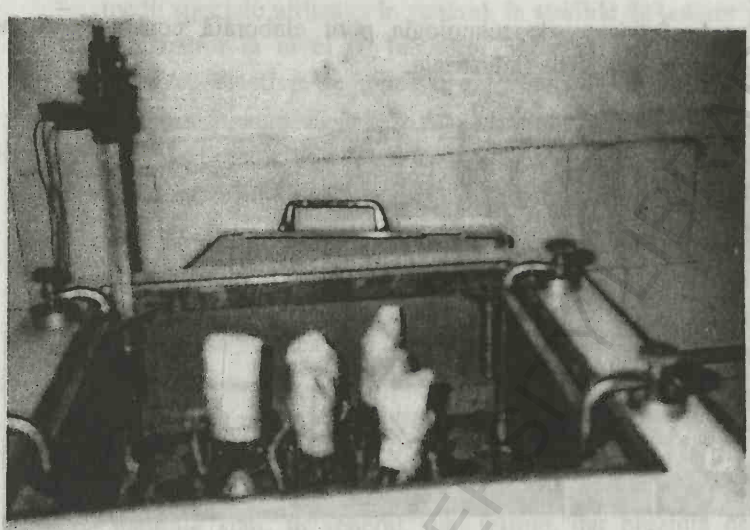


Fig. 5.1. Instalație de laborator cu flacoane agitate pentru obținerea enzimelor prin fermentație.

5.2. FAZA DE STAȚIE PILOT

Faza de biosinteză propriu-zisă se realizează în aparate speciale, numite bioreactoare de diferite capacități (10 l, 100 l, 1 m^3, 10 m^3, 100 m^3), fiind precedată de operații de sterilizare a aparaturii utilizate și a mediului de cultură stabilit, la nivel de laborator, ca fiind optim. Începutul fazei de biosinteză este considerat momentul transvazării culturii inocul în mediul de cultură sterilizat și răcit la temperatura de cultivare a microorganismului producător. Când raportul între capacitatea de inocul și cantitatea de mediu de fermentație (numit raport de inoculare) nu permite pregătirea culturii inocul în laborator, este necesară introducerea unei trepte intermediare de cultivare, numite „cultură intermediară".

În faza de stație pilot, tehnologia elaborată la nivel de laborator este verificată și optimizată pe instalații de biosinteză de capacitate medie (pilot). În figura 5.2, se poate vedea un echipament micropilot (bioreactor de tip „Biotech Braun" de capacitate 5 l), utilizat pentru producția de enzime (Facultatea de Biotehnologii, București).

Pe baza datelor de cercetare obținute la nivel pilot, se elaborează așa-numitul „proces tehnologic pilot" care urmează o fază de experimentare industrială și apoi producția propriu-zisă de enzimă.

Datele furnizate de tehnologia pilot elaborată constituie elemente de proiectare pentru instalațiile industriale.

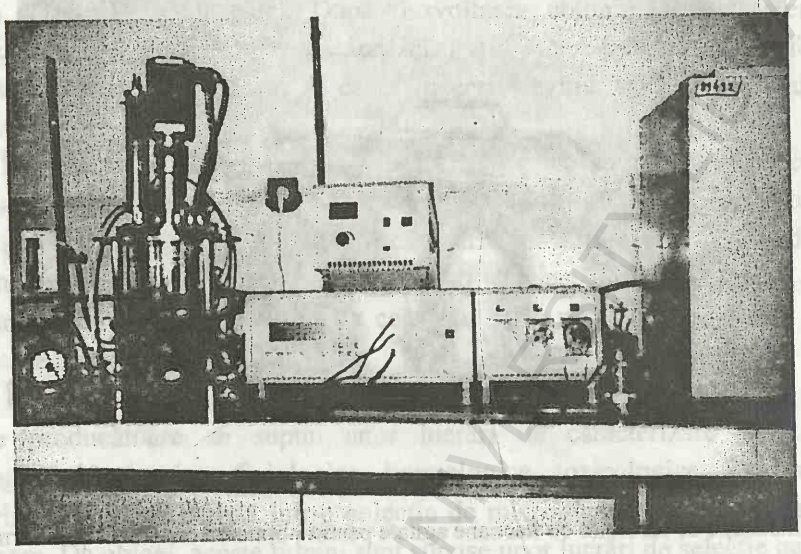


Fig. 5.2. Bioreactor de laborator, pentru obținerea enzimelor prin fermentație.

5.3. MEDII DE CULTURĂ

În procesele biotehnologice, mediile de cultură sunt constituite din suporturi nutritive sterilizate care permit dezvoltarea și studiul unui microorganism, în afara nișei ecologice naturale. Compoziția mediilor de cultură are o mare importanță asupra reproductibilității și eficienței tehnologiei respective.

În funcție de consistență, compoziție, scopul utilizării, mediile de cultură se clasifică astfel:

- după consistență: medii lichide, solide, semisolide;
- după compoziție:
  - medii naturale, care conțin elemente nutritive, de origine vegetală sau animală;
  - medii sintetice, care conțin numai compuși cu structură chimică cunoscută, care pot fi dozați;
- după tipul respirator al microorganismelor cultivate: medii pentru microorganisme aerobe sau anaerobe;
- după scopul și frecvența întrebuințării:
  - medii de uz curent;

– medii speciale utilizate, în general, în studiile de izolare a microorganismelor la nivel de laborator. Acestea pot fi, la rândul lor: elective, selective, de îmbogățire, de conservare, de identificare;

- după faza de biosinteză la care este utilizat mediul de cultură poate fi mediu laborator, pilot sau mediu de cultură industrial;
- după destinația finală a culturii dezvoltate mediile pot fi:
  – pentru cultura inocul;
  – pentru cultura de regim, numite și medii de fermentație sau medii de biosinteză.

În biotehnologie se utilizează în mod curent mediile naturale având la bază subproduse agroalimentare: șrot de floarea-soarelui, de soia, făină de porumb, tărâțe de grâu, extract de porumb. Aceste medii conțin, în general, elemente nutritive necesare dezvoltării microorganismelor, completându-se de obicei cu cantități mici de săruri minerale.

Mediile naturale sunt, în general, mai ieftine, dar prezintă dezavantajul variabilității compoziției, ceea ce nu permite o standardizare corespunzătoare și, în consecință, nu permite reproducerea procesului de biosinteză cu un randament constant.

Spre deosebire de mediile naturale, mediile sintetice sunt perfect reproductibile la scară industrială.

Un mediu de cultură utilizat pentru dezvoltarea microorganismelor trebuie să conțină întotdeauna:

– o sursă de carbon (în general glucide: glucoză, amidon, lactoză, zaharoză etc.);

– o sursă de azot, care poate fi organic (aminoacizi, proteine, uree) sau anorganic (NH_3, $(NH_4)_2SO_4$ etc.);

– o sursă de fosfor (H_3PO_4, $(NH_4)_3PO_4$, KH_2PO_4 etc.);

– oligoelemente: K (din KCl sau K_2HPO_4), Mg (din $MgSO_4$), Fe (din $FeCl_3$);

– microelemente: Mn, Ni, Co, W;

– factori de creștere: aminoacizi, proteine, vitamine, coenzime. Compoziția mediului nutritiv specific pentru un microorganism se stabilește în laborator, prin cultivarea acestuia, alegându-se astfel, în funcție de scopul urmărit, mediul optim de cultivare.

Uneori, pentru creșterea randamentului în faza de biosinteză, se adaugă la mediu precursori care sunt substanțe având porțiuni structurale ale moleculei produsului de biosinteză.

În procesele de biosinteză, sursa principală de energie o constituie sursa de carbon, respectiv glucidele. În procesele catabolice, prin oxidarea biochimică a glucozei se eliberează o mare cantitate de energie, din care o parte este înma-

gazinată în compuşii macroergici (ATP), iar restul este preluat de mediul de cultură cu ajutorul sistemelor de termostatare ale bioreactoarelor. Sursa de carbon furnizează, de asemenea, necesarul de oxigen şi hidrogen în scopul dezvoltării microorganismului.

În 1970, Peppler şi Harrison au demonstrat că există o valoare minimă a concentraţiei elementelor în mediul de cultură, necesară dezvoltării nerestrictive a microorganismului. Mediile de cultură utilizate în bioprocesele microbiene trebuie să conţină elementele esenţiale: carbon, azot, sulf, oxigen, fosfor, magneziu, calciu şi numeroase alte elemente în cantităţi foarte mici (urme): fier, cupru, cobalt, zinc, mangan, molibden, care sunt necesare funcţiilor celulare de bază [Bridson şi Brecker, 1970]. De cele mai multe ori este însă nevoie să se utilizeze un mediu de cultură cât mai ieftin şi posibil de reprodus o perioadă cât mai lungă de timp. Aceasta conduce la utilizarea unor substraturi cât mai ieftine şi mai accesibile în conjunctura economică respectivă; înlocuirea unui component din compoziţia mediului nutritiv conduce la variaţii în randamentul de producere, astfel încât studiul aprofundat al influenţei diferitelor componente ale mediului de cultură asupra biosintezei constituie un element important al cercetărilor în domeniul biotehnologiei.

Sursa de carbon utilizată în compoziţia mediilor de cultură este suplinită în mod obişnuit de glucide de o anumită puritate sau de un material natural conţinând un amestec de glucide. Astfel, melasa de sfeclă sau de trestie este folosită în multe cazuri drept sursă de zaharoză. Alte surse de carbon utilizate: siropul de glucoză, amidonul de porumb sau de cartofi, hidrolizatul de amidon de cereale (grâu, orez, porumb) sunt în mod frecvent folosite ca surse de glucoză, iar zerul ca sursă de lactoză. Ratledge a făcut o trecere în revistă a tuturor surselor de carbon posibil de utilizat în industria fermentativă [Ratledge, 1977].

Sursa de azot poate fi reprezentată în diferite forme de surse anorganice (amoniacul, sărurile de amoniu) sau amestecuri complexe (extract de drojdie, extract de porumb, peptonă, făină de soia sau distilate solubile). Fosforul, sulful şi cationii esenţiali sunt, în general, suplinişi de sărurile anorganice. Uneori se adaugă elemente specifice în cantităţi mici, dar de obicei acestea sunt aduse de apă sau de alte componente ale mediului. Dintre factorii de creştere, tiamina şi biotina sunt necesare pentru creşterea microorganismelor. Medii tipice utilizate în producţia de enzime bacteriene şi fungice au fost descrise de Aunstrup şi Lambert [Aunstrup, 1979; Lambert, 1983].

6. BIOREACTOARE

Principalul scop al biotehnologiei este obținerea de produse sau servicii utile activității umane, cu ajutorul organismelor vii.

Procesul de bază în biotehnologie este „procesul biologic", după cum procesul de bază în tehnologia chimică este „procesul chimic". Spațiul în care se desfășoară o reacție sau un proces chimic se numește „reactor chimic". În mod asemănător, spațiul în care se desfășoară un proces biologic se numește bioreactor.

Deși procesul de bază din tehnologia de biosinteză este „procesul biologic", el aparține, totuși, domeniului ingineriei biochimice, care se ocupă de studiul proceselor de fermentație aerobă și anaerobă, al reacțiilor enzimatice, precum și de procese specifice industriei fermentative, cum ar fi: sterilizarea, pasteurizarea, liofilizarea, uscarea prin atomizare, izolarea și purificarea produselor extrase din mediile biologice.

Descoperirile succesive și dezvoltarea spectaculoasă a biotehnologiei au favorizat atât studiul aprofundat al proceselor implicate, cât și al aparaturii utilizate, în principal, al bioreactoarelor. S-a născut astfel „bioingineria", care studiază bioprocesele sub toate aspectele (modul de desfășurare, cinetică, transfer de masă și căldură), oferind soluții de optimizare a procesului biotehnologic.

În bioreactor, transformarea materiilor prime este realizată de sistemul enzimatic al microorganismelor vii, al celulelor animale și vegetale sau de enzimele izolate din acestea. Reușita experimentului biotehnologic depinde în cea mai mare măsură de condițiile optime de creștere a microorganismelor create în bioreactor. Celulele se luptă continuu cu modificările din mediul înconjurător, astfel încât să obțină și să-și mențină condițiile optime de creștere. Într-un bioreactor, această tendință a celulelor este asistată, este controlată în mod continuu. Reactorul trebuie să asigure aprovizionarea continuă a celulelor cu mijloacele necesare creșterii sau producerii de metaboliți, asigurând pe cât este posibil valorile optime pentru *p*H, temperatură, concentrația substratului, concentrațiile în săruri minerale, factorii de creștere și pentru concentrația în oxigen.

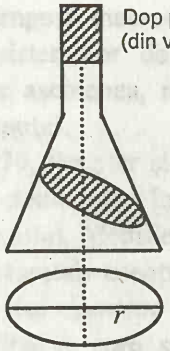


Fig. 6.1. Flacon Erlenmeyer agitat:
$2r$ –amplitudinea agitării; volum: 50 – 2000 ml;
grad de umplere: ≤ 20%.

Condiţiile optime pentru tulpinile selecţionate sunt determinate, de regulă experimental. Această determinare se efectuează în laborator, cel mai frecvent în culturi agitate (fig. 6.1) (în flacoane Erlenmeyer).

Acestea au dezavantajul că *p*H-ul şi concentraţia oxigenului dizolvat nu pot fi controlate; de obicei, numai temperatura optimă, compoziţia mediului nutritiv şi suplimentarea cu substrat sunt elementele care pot fi determinate şi controlate, prin incubare la termostat şi prelevare de probe la anumite intervale de timp.

Optimizarea *p*H-ului şi a concentraţiei oxigenului dizolvat în mediul de cultură poate fi efectuată în general în bioreactoare de laborator care pot fi prevăzute cu: control al *p*H-ului, agitator şi măsurarea debitului de aer.

În legătură cu reactorul în care trebuie să aibă loc procesul biologic sau biochimic, apar următoarele probleme importante:

– care este cel mai bun reactor pentru o transformare biochimică dată;

– cum se calculează mărimea şi volumul interior util, alte elemente constructive al bioreactorului;

– care sunt condiţiile optime de operare, astfel încât bioreactorul să realizeze performanţele dorite.

Fenomenele care au loc în bioreactor au un caracter complex, datorită interdependenţei fenomenelor de transfer cu cele biochimice. Analiza procesului trebuie să ia în considerare, pe lângă reacţiile biochimice propriu-zise, şi fenomenele fizice cu care acestea interacţionează şi anume: curgerea, transferul de masă şi transferul de căldură, prezente în orice reactor industrial. Descrierea cantitativă a acestor fenomene furnizează ecuaţiile cu ajutorul cărora bioreactorul poate fi analizat, optimizat, dimensionat, reglat.

Procesul biotehnologic industrial poate fi reprezentat schematic printr-o succesiune de trepte de prelucrare fizice şi biochimice (fig. 6.2).

Prima treaptă include operaţiile de pregătire şi sterilizare a mediului de cultură, sterilizarea utilajelor şi a aerului tehnologic.

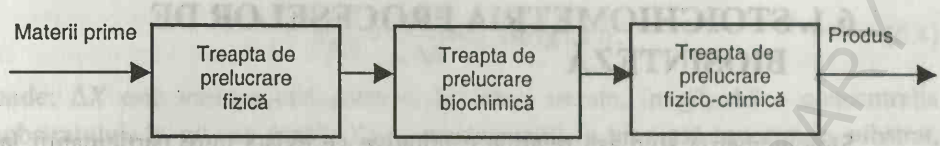


Fig. 6.2. Reprezentare schematică a unui proces biotehnologic.

Treapta a doua include, de fapt, biosinteza propriu-zisă, având loc în final obținerea produsului printr-un proces de fermentație aerobă sau anaerobă.

Treapta a treia include operațiile de separare și condiționare a produselor de biosinteză.

Procesul de fabricație conduce la un produs competitiv, dacă se respectă atât condițiile de calitate, cât și de preț. În cazul produselor de fermentație, rațiunile economice conduc la capacități mari de fermentare. Aceasta impune cunoașterea fenomenelor ce au loc în bioreactoarele de capacitate mare. Informațiile obținute la scară mică nu sunt adecvate pentru scară mai mare, întrucât dinamica fluidelor, procesele de transport și chiar comportarea celulelor se schimbă considerabil, când volumul bioreactorului este mai mare.

Pentru a micșora riscul în procesul de realizare la scară industrială a unui proces biotehnologic stabilit în laborator, este necesară construirea unei instalații pilot care să furnizeze informații intermediare și foarte utile pentru proiectul industrial; trecerea de la model la producție poate fi adesea ușurată cu ajutorul teoriei similitudinii. Aceasta stabilește criterii care permit calcularea mărimilor fizice ale sistemului la scară mare, bazat pe rezultatele obținute în modelul experimental, la scară mică. Pentru fiecare proces elementar, factorii determinanți pot fi incluși într-un număr caracteristic, denumit criteriu de similitudine; acesta trebuie să rămână constant pentru ca procesul la nivel industrial să se desfășoare în mod similar cu procesele de laborator și pilot. Dacă această similitudine este asigurată, atunci, rezultatele care s-au obținut în laborator sau pilot pot fi utilizate pentru proiectarea reactorului industrial.

Înainte de alegerea modului de operare (discontinuu, continuu, semicontinuu), a tipului, a mărimii și a condițiilor de operare, este necesară o alegere preliminară a tipului de reactor în funcție de microorganismul utilizat, mediul de cultură și de caracteristicile procesului biochimic. Alegerea tipului de bioreactor se efectuează în momentul în care bioprocesul se află încă în faza de cercetare, de obicei în perioada de experimentare la nivel pilot.

6.1. STOICHIOMETRIA PROCESELOR DE BIOSINTEZĂ

Stoichiometria studiază relaţiile cantitative ce există între participanţii la reacţiile chimice (biochimice), cunoscând compoziţia chimică a reactanţilor şi produşilor.

Un bioproces poate fi descris pe baza observării modificărilor macroscopice ce apar datorită dezvoltării culturii, modificări traduse de obicei prin variaţii de *p*H, concentraţii de substrat, celule, produşi de reacţie.

Utilizând randamentele (în raport cu substratul sau în raport cu produsul), pentru un proces de biosinteză se poate scrie ecuaţia generală:

$$Substrat + O_2 + NH_3 \rightarrow Y_{X/S}\ Biomasa + Y_{X/P}\ Produs + CO_2 + H_2O \qquad (6.1)$$

Dacă se cunoaşte compoziţia chimică elementară a substratului, biomasei şi produsului, ecuaţia anterioară devine:

$$a_1C_xH_yO_z + a_2O_2 + a_3NH_3 + (sursa\ de\ P,K,Mg,Fe..) \rightarrow \\ \rightarrow b_1C_sH_tO_uN_v + b_2C_{s'}H_{t'}O_{u'}N_{v'} + b_3CO_2 + b_4H_2O \qquad (6.2)$$

unde: $C_xH_yO_z$ este formula sursei de carbon; $C_sH_tO_uN_v$ – formula biomasei; $C_{s'}H_{t'}O_{u'}N_{v'}$ – formula produsului secundar.

Pentru aplicarea acestei ecuaţii este necesară, în primul rând, cunoaşterea compoziţiei chimice a biomasei şi a produsului secundar pentru a se putea calcula „formulele acestora". După cum se poate observa, în această ecuaţie sunt şase necunoscute (a_1, a_2, b_1, b_2, b_3, b_4), care de obicei se reduc la cinci, deoarece ecuaţiile stoechiometrice se descriu pentru 1 mol de substrat ($a_1 = 1$); a_3 este cunoscut, fiind măsurat la adăugare. Pentru ca sistemul să fie determinat, vom avea nevoie de cinci ecuaţii. Patru dintre acestea se obţin făcând bilanţul celor patru elemente (C, H, O, N), cea de-a cincea necunoscută putând fi determinată fie prin analiză chimică, fie prin calcularea „coeficientului respirator" adică:

$$RQ = \frac{Moli\ CO_2\ formaţi}{Moli\ O_2\ consumaţi}. \qquad (6.3)$$

Aceste ecuaţii sunt utile atât în determinarea consumurilor specifice, cât şi pentru calcularea efectului termic al bioprocesului.

Referitor la randamentul de transformare pentru un bioproces, studiind eficienţa obţinerii biomasei, Monod (1942) a constatat că greutatea celulelor produse a fost proporţională cu cantitatea de sursă de carbon consumată, atâta timp cât aceasta a fost factorul limitativ, toate celelalte componente existând în exces.

Astfel, pentru caracterizarea bioprocesului se poate calcula un randament în biomasă raportat la substrat definit astfel: cantitatea de substrat consumat pentru obţinerea unui gram sau mol de biomasă:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} [g/g] \text{ sau } [g/mol], \quad (6.4)$$

unde: ΔX este variația concentrației biomasei uscate, în g/l; ΔS – concentrația substratului, în g/l sau mol/l; $Y_{X/S}$ – randamentul în biomasă raportat la substrat, în g celule/g substrat sau g celule/mol substrat. Pentru simplificare se notează $Y_{X/S} = Y_S$.

Pentru procesele aerobe, se poate defini prin analogie cu ecuația (6.4) un randament în biomasă față de oxigenul consumat ($Y_{X/O}$):

$$Y_{X/O} = \frac{\Delta X}{-\Delta O_2} [g/mol], \quad (6.5)$$

în care: ΔO_2 este variația concentrației oxigenului dizolvat, în mol/l; $Y_{X/O}$ – randamentul bioprocesului raportat la concentrația oxigenului dizolvat. Pentru simplificare se notează $Y_{X/O} = Y_O$.

Semnul „–" din ecuațiile (6.4) și (6.5) semnifică faptul că într-un proces de biosinteză atât concentrația substratului cât și a oxigenului descresc în timp.

6.2. MODELE MATEMATICE ALE CREȘTERII MICROBIENE. ECUAȚIA MONOD

Creșterea microorganismelor este un fenomen foarte complex, datorită numărului mare de reacții implicate și a interdependenței dintre ele. Este foarte dificil să se stabilească un model matematic care să cuprindă toate reacțiile biologice și efectele fiziologice determinate de mediu. Din acest motiv, modelele propuse pentru bioprocese conțin, de fapt, ecuații de bază ale creșterii microorganismelor. Acestea au fost deduse în condiții ideale, în care toți nutrienții necesari pentru o creștere echilibrată sunt prezenți în exces.

De asemenea, s-a plecat de la următoarele ipoteze:

– s-a considerat că microorganismul, în dezvoltarea sa, urmează aceeași cale de diviziune celulară și anume: celula crește în mărime până la un punct, după care celula parentală se scindează în două celule-fiice identice. Această ipoteză nu ține cont de faptul că la drojdii, de exemplu, fenomenul de înmulțire are loc prin înmugurire. Deci, se pleacă de la ipoteza următoare: calea pe care o urmează dezvoltarea unei populații va fi aceeași, indiferent de modul de organizare și de structura organismului viu;

– se presupune că se mențin condițiile ideale și deci că produșii de metabolism nu vor modifica condițiile fizico-chimice predominante ale mediului

înconjurător (ceea ce în realitate este valabil doar la începutul fazei de creştere a microorganismului);

– se presupune că toate celulele vor consuma nutrienţii disponibili şi vor creşte în mărime exact cu aceeaşi viteză.

Procesul de biosinteză, în general, a fost studiat de mulţi cercetători, care au încercat să elaboreze diferite modele matematice, în scopul reprezentării cât mai apropiate de realitate, a cineticii de desfăşurare a acestuia. Astfel de modele au fost elaborate, de exemplu, de Monod, Komo, Verhoft.

Ecuaţia Monod. Monod este primul care a descris variaţia în timp a concentraţiei (X) de celule microbiene din mediul de biosinteză, stabilind o relaţie între concentraţia substratului limitativ şi viteza specifică de creştere. El a adaptat ecuaţia Michaelis-Menten, din cinetica enzimatică, la creşterea microorganismelor şi a stabilit ecuaţia generală:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \,, \tag{6.6}$$

valabilă pentru cazul în care nutrienţii sunt prezenţi în cantităţi nelimitate, în care: X este concentraţia de celule microbiene din mediul de biosinteză, în $g \cdot l^{-1}$ (concentraţia în biomasă); t – timpul de dezvoltare (cultivare), în h; μ – viteza specifică de creştere, în h^{-1}.

Astfel de condiţii pot exista doar pentru perioade scurte de timp (la începutul unei cultivări în şarjă, de exemplu, când nutrienţii sunt în exces).

Pentru faza exponenţială, dacă integrăm ecuaţia (6.6) între următoarele limite: 0 şi t pentru timp şi între X_0 şi X pentru concentraţia de celule, obţinem:

$$\int_{X_0}^{X} \frac{dX}{X} = \int_0^t \mu \cdot dt \,;$$

$$\ln X - \ln X_0 = \mu \cdot t \,;$$

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu \cdot t \,;$$

$$X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \,, \tag{6.7}$$

în care X_0 este valoarea concentraţiei de celule la timpul $t = 0$.

Monod consideră că viteza specifică de dezvoltare, în cursul unui proces de biosinteză, depinde de concentraţia (C) a unui component din mediul de cultură, cu rol limitativ. Variaţia vitezei specifice de dezvoltare respectă în acest caz cinetica Michaelis-Menten:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C}{K + C} \,, \tag{6.8}$$

în care: μ_{max} este viteza specifică de dezvoltare maximă, în h^{-1}; μ – viteza specifică

de creştere, în h^{-1}; C – concentraţia componentului limitativ, în g/l; K – constantă de saturare care este echivalentă cu valoarea lui C la care viteza de creştere este egală cu $\mu_{max}/2$, în g/l.

Ecuaţia (6.8) este reprezentată grafic în figura 6.3.

Componentul limitativ din mediul de biosinteză poate fi: sursa de carbon (de exemplu, glucoza), sursa de azot (de exemplu, un aminoacid esenţial din mediul de cultură), sursa de fosfor anorganic sau oxigenul.

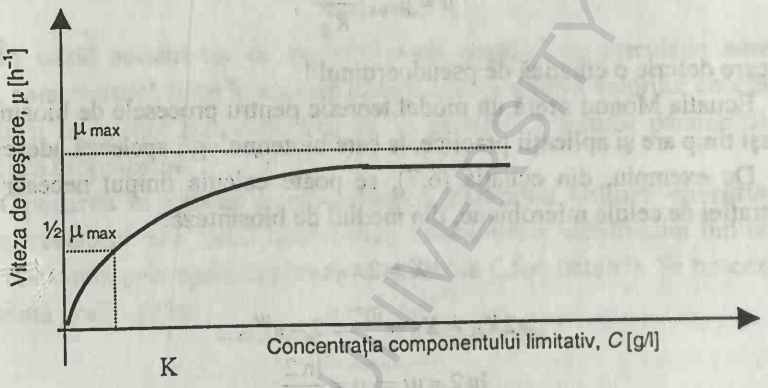


Fig. 6.3. Dependenţa vitezei specifice de creştere de concentraţia componentului limitativ din mediul de cultură.

Când componentul limitativ este un nutrient, atunci el se numeşte substrat limitativ iar concentraţia sa se notează cu S; în acest caz ecuaţia (6.8) devine:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \tag{6.9}$$

în care: S este concentraţia substratului limitativ; K_S – constanta de saturare cu substrat (constanta Monod).

În cazul în care componentul limitativ este oxigenul, relaţia (6.8) devine:

$$\mu = \mu_{max} \frac{C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}}, \tag{6.10}$$

în care: C_{O_2} este concentraţia în oxigen dizolvat; K_{O_2} – constanta de saturare în oxigen.

Constanta de saturare este o măsură a afinităţii organismului pentru substratul limitativ; o valoare mai mică a lui K_S înseamnă o afinitate mai mare pentru substratul limitativ şi, deci, o capacitate mai mare de a creşte rapid la concentraţii scăzute de substrat limitativ.

Pe baza ecuației (6.9) se pot determina valorile vitezelor specifice de creștere μ pentru cazurile extreme ale unor concentrații foarte mari și respectiv foarte mici de substrat astfel:

– la concentrații mari de substrat ($S >> K_S$) ecuația (6.9) devine:

$$\mu = \mu_{max}, \tag{6.11}$$

descriind o comportare de pseudoordinul zero;

– la concentrații mici de substrat ($S << K_S$), ecuația (6.9) se transformă în:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S}, \tag{6.12}$$

relație care descrie o cinetică de pseudoordinul I.

Ecuatia Monod oferă un model teoretic pentru procesele de biosinteză, dar în același timp are și aplicații practice, la care biotehnologii apelează adesea.

De exemplu, din ecuația (6.7), se poate calcula timpul necesar dublării concentrației de celule microbiene, din mediul de biosinteză:

$$X = 2X_0;$$

$$2X_0 = X_0 \cdot e^{\mu t} \Rightarrow 2 = e^{\mu t};$$

$$\ln 2 = \mu t \Rightarrow \mu = \frac{\ln 2}{t}; \tag{6.13}$$

$$\mu = \frac{0{,}693}{t} \Rightarrow t = \frac{0{,}693}{\mu}.$$

Determinând experimental viteza specifică de creștere μ, se poate calcula ușor timpul necesar obținerii unei anumite cantități de biomasă într-un proces de biosinteză dat.

6.3. CONCEPTE DE BAZĂ ÎN OPERAREA BIOREACTOARELOR

Există două sisteme majore de cultivare a microorganismelor care s-au impus cu timpul în domeniul biotehnologiei:

– în sistem submers;

– în culturi de suprafață.

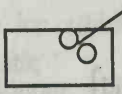
În cazul cultivării microorganismelor în sistem submers, mediul de cultură este lichid, agitat și aerat; din punct de vedere al continuității procesului, se disting trei moduri de operare: discontinuu, semicontinuu și continuu.

Operarea în sistem discontinuu, adică în șarje (sistem *batch*). Cultivarea începe la timpul $t = 0$ și se termină la timpul $t = t'$. La început, proliferarea

celulelor are loc în condiţii nelimitative. După ce s-a atins densitatea maximă în celule are loc operarea în condiţii limitative de substrat. Substratul se referă la unul dintre nutrienţi (sursa de carbon, sursa de azot etc.) sau la oxigen.

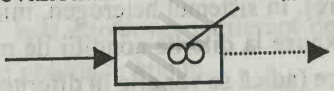
În particular, pentru oxigen, care este consumat foarte rapid, o aprovizionare continuă în mediu este posibilă, astfel încât concentraţia sa să nu scadă sub o valoare critică specifică microorganismului.

Operarea în sistem discontinuu se notează *DC*, fiind reprezentată grafic astfel:



În cazul acestui tip de operare avem regimul de circulaţie amestecare perfectă, caracteristică fiind în această situaţie uniformitatea valorilor concentraţiei, temperaturii în spaţiul bioreactorului şi, în general, a tuturor parametrilor care influenţeaza bioprocesul.

Operarea în sistem semicontinuu („extended culture operation"). În acest caz, reactorul este astfel operat încât concentraţia substratului limitativ este păstrată constantă prin aprovizionarea sa continuă („fed batch"). Se notează *SC* şi se reprezintă grafic astfel:



Operarea în sistem continuu („continuous operation"). Aceasta presupune alimentarea continuă cu nutrienţi şi în acelaşi timp evacuarea din reactor a unei cantităţi echivalente de mediu de cultură.

Cultivarea continuă poate fi realizată în două tipuri de reactoare ideale: *R* şi *D*. Pentru reactorul *R* (cu recirculaţie) se impune amestecare perfectă, deci un grad foarte mare de omogenitate, iar în cazul reactorului *D* (cu deplasare) se consideră o curgere tip piston (fig. 6.4).

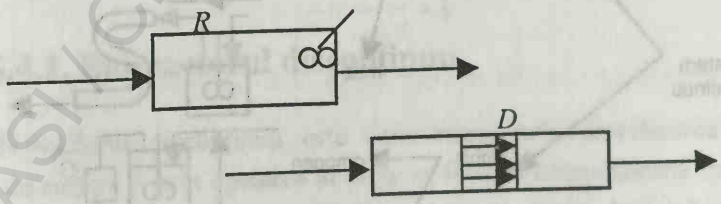


Fig. 6.4. Reprezentarea schematică a reactoarelor *R* şi *D*.

În modelul cu deplasare ideală, *D*, elementele dintr-o secţiune transversală, o dată intrate în reactor, se deplasează prin translaţie în direcţie axială prin reactor; nu există elemente de fluid care să depăşească alte elemente de fluid. Cantitativ, acest model se exprimă prin constanţa vitezei fluidului în secţiunea transversală.

În biotehnologie, există însă şi sistemul de cultivare a microorganismelor în culturi de suprafaţă în care mediul de cultură poate fi solid sau semisolid, astfel încât, dacă se ţine seama de omogenitatea fazelor se poate face o clasificare a bioreactoarelor în:

- omogene: $L-L$
- heterogene $\begin{cases} L-S \\ G-L-S \end{cases}$

unde:

- $L-L$: lichid – lichid } monofazice
- $L-S$: lichid – solid } multifazice
- $G-L-S$: gaz – lichid – solid }

În sistemele omogene, compoziţia mediului de fermentaţie este uniformă pe tot parcursul bioprocesului. În sistemele heterogene, în mediul de fermentaţie există gradiente de celule sau de substrat. În sistemul omogen, în orice moment, microorganismele din diferite zone ale sistemului au aceeaşi stare fiziologică (acelaşi stadiu de dezvoltare). În sistemul heterogen, microorganismele din diferite zone ale sistemului sunt expuse la diferite condiţii de mediu şi, în consecinţă, vor avea diferite stări fiziologice (adică se vor afla în diferite stadii de dezvoltare).

Sistemele de operare continuă sunt prezentate în figura 6.5.

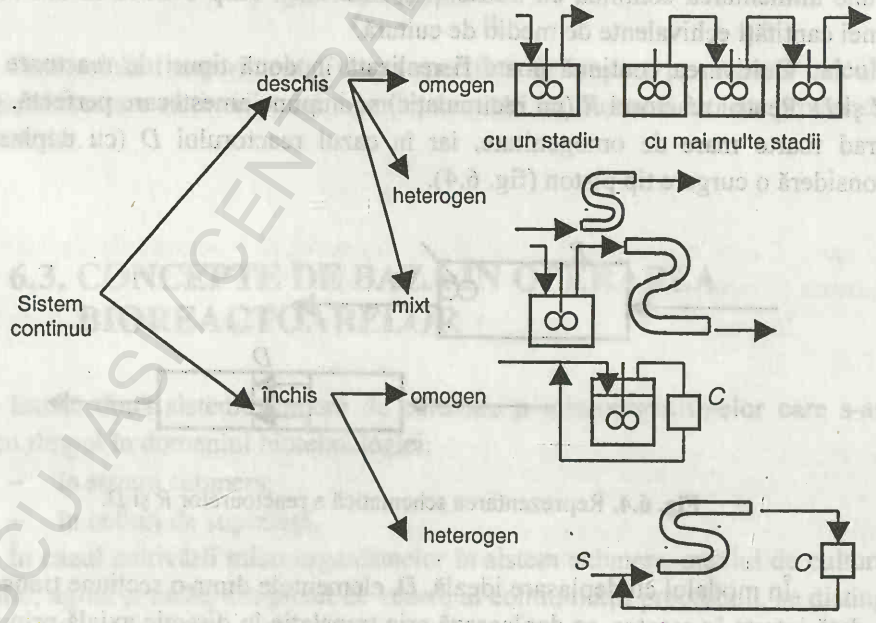


Fig. 6.5. Sisteme de operare continuă:
S – substrat; C – celule.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Un alt criteriu care stă la baza clasificării bioreactoarelor este regimul termic.

Pentru reactoarele chimice, se pot practica următoarele regimuri:

– izoterm: au loc schimburi de căldură cu exteriorul, temperatura rămânând constantă;

– adiabat: nu au loc schimburi de căldură cu exteriorul;

– neizoterm-neadiabat: au loc schimburi de căldură cu exteriorul, iar temperatura în reactor nu este constantă;

– programat: se modifică regimul termic, astfel încât să se atingă un optim dorit;

– autoterm: reactorul se susține singur din punct de vedere termic.

Reacțiile chimice pot fi exoterme, cu degajare de căldură ($\Delta I_R < 0$) sau endoterme, cu absorbție de căldură din mediul exterior ($\Delta I_R > 0$). Reacțiile chimice exoterme pot fi conduse în oricare din regimurile termice specificate, pe când cele endoterme nu pot fi operate autoterm.

Reacțiile biologice sunt exoterme, indiferent de microorganismul utilizat, de condițiile de lucru sau de produșii obținuți.

Deşi cantitatea de căldură degajată în urma proceselor biologice este mică în comparație cu cea degajată în procesele chimice, nu trebuie neglijată deoarece materialul biologic (microorganisme, enzime) este foarte sensibil la variațiile de temperatură.

6.4. CARACTERIZAREA BIOREACTOARELOR

6.4.1. Bioreactorul discontinuu

Bioreactorul discontinuu este caracterizat prin amestecarea ideală a mediului de cultură şi prin operarea în şarje: se încarcă componentele mediului, se inoculează, iar după un interval de timp determinat se descarcă mediul de fermentație conținând produşii de biosinteză. Anterior, s-a arătat că dinamica de creştere a populației microbiene poate fi descrisă de ecuația (6.6):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

iar variația concentrației substratului, prin relația:

$$Y_S = \frac{\Delta X}{-\Delta S};$$

$$\Delta X = Y_S \cdot \Delta S;$$

$$X - X_0 = Y_S \cdot (S_0 - S);$$

$$S = S_0 - \frac{X - X_0}{Y_S}. \qquad (6.14)$$

Dacă pentru *viteza specifică de creştere* admitem o cinetică de tip Monod:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S}.$$

Prin înlocuirea lui μ, în ecuaţia (6.6) se obţine:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \cdot X \qquad (6.15)$$

sau, prin integrare între limitele de timp t şi t_0, rezultă:

$$\int_{X_0}^{X} \frac{K_S + S}{\mu_{max} \cdot X \cdot S} dX = \int_{t_0}^{t} dt. \qquad (6.16)$$

Atunci, timpul necesar obţinerii unei concentraţii celulare X se poate calcula astfel:

$$t - t_0 = \frac{1}{\mu_{max}} \int_{X_0}^{X} \left(\frac{K_S}{S \cdot X} + \frac{1}{X} \right) dX. \qquad (6.17)$$

În cazul particular, când S este mult mai mare decât K_S, $\frac{S}{S + K_S} \to 1$ şi atunci se obţine:

$$t = \frac{1}{\mu_{max}} \ln \frac{X}{X_0}. \qquad (6.18)$$

Determinarea duratei reacţiei pentru cazul general se poate face şi grafic, dacă se reprezintă datele experimentale ca $\frac{1}{\Delta X / \Delta t} = f(X)$ şi se planimetrează suprafaţa de sub curbă.

În cazul bioreactorului discontinuu *consumul de substrat* se defineşte cu relaţia:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_S} \cdot \frac{dX}{dt} \qquad (6.19)$$

întrucât randamentul a fost definit anterior prin relaţia (6.4):

$$Y_S = \frac{\Delta X}{-\Delta S}.$$

BCU SIBIU CENTRUL UNIVERSITY LIBRARY

Înlocuind în relația (6.19): $\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$, conform ecuației Monod (6.6) obținem:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_S}\mu \cdot X . \tag{6.20}$$

Productivitatea în celule este:

$$PR = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X . \tag{6.21}$$

Aceste relații sunt valabile când nutrienții sunt în cantități nelimitate.

Când *substratul este limitat*, avem relațiile:

– *viteza de creștere*:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S}; \tag{6.22}$$

– *consumul de substrat*:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_S} \cdot \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot X ; \tag{6.23}$$

– *productivitatea*:

$$PR = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \cdot X . \tag{6.24}$$

În condițiile *limitării concentrației de oxigen dizolvat* avem relațiile:

– *viteza de creștere*:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}};$$

– *consumul de* O_2:

$$-\frac{dC_{O_2}}{dt} = \frac{1}{Y_0} \cdot \mu_{max} \cdot \frac{C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}} \cdot X ;$$

– *productivitatea*:

$$PR = \mu \cdot X = \mu_{max} \frac{C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}} \cdot X .$$

În cazul cultivării microorganismelor în sistem discontinuu (șarjă), pe măsura creșterii populației, mediul de cultură își modifică compoziția atât datorită consumării nutrienților, cât și datorită formării unor produși secundari ce se acumulează în sistem.

PCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6.4.2. Bioreactorul continuu

În cazul cultivării continue, prelungirea fazei de creştere exponenţială un timp nedefinit se realizează prin adăugarea continuă în reactor a unei soluţii de mediu proaspăt cu un debit volumetric F şi eliminarea continuă a biomasei cu acelaşi debit, astfel încât volumul biomasei din fermentator să rămână constant.

Pentru stabilirea ecuaţiei ce generează dezvoltarea microorganismelor, trebuie să se ţină seama de faptul că variaţia concentraţiei biomasei este datorată existenţei a două fenomene antagoniste:

- creşterea numărului microorganismelor datorită dezvoltării populaţiei;
- scăderea cantităţii de microorganisme datorită eliminării lor din sistem.

Ecuaţia de bilanţ pentru biomasă este:

Biomasă alimentată + Biomasă existentă + Biomasă generată = Biomasă rămasă + + Biomasă ieşită cu efluentul.

Deoarece în acest caz se alimentează doar mediu de cultură (fără celule), primul termen este zero.

Calculând bilanţul pentru un interval de timp mic Δt, dacă concentraţia biomasei este X la momentul t, atunci la momentul $t + \Delta t$ ea va avea valoarea:

$$X + \Delta X .$$

Ştiind că masa celulelor se obţine prin înmulţirea concentraţiei lor cu volumul de lucru (presupus constant), ceilalţi termeni se calculează astfel:

- biomasă existentă:

$$X \cdot V \qquad \left[\frac{g}{l} \cdot l\right] = [g];$$

- biomasă generată în intervalul Δt

$$\mu \cdot X \cdot V \cdot \Delta t \qquad \left[\frac{1}{h} \cdot \frac{g}{l} \cdot h \cdot l\right] = [g];$$

- biomasă rămasă în reactor la momentul $t + \Delta t$, care are concentraţia $X + \Delta X$:

$$(X + \Delta X) \cdot V \qquad \left[\frac{g}{l} \cdot l\right] = [g];$$

- biomasă ieşită în intervalul Δt:

$$(X + \Delta X) \cdot \Delta t \cdot F \qquad \left[\frac{g}{l} \cdot h \cdot \frac{l}{h}\right] = [g],$$

unde F este debitul volumetric.

Introducând termenii explicitaţi în ecuaţia de bilanţ, se obţine:

$$X \cdot V + \mu \cdot X \cdot \Delta t \cdot V = (X + \Delta X) \cdot V + (X + \Delta X)\Delta t \cdot F .$$

Reducând termenii din această relaţie, se obţine:

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\mu \cdot X \cdot \Delta t \cdot V = \Delta X \cdot V + \underbrace{\Delta X \cdot \Delta t \cdot F}_{0 - \text{pentru că e foarte mic}} + F \cdot X \cdot \Delta t ,$$

Considerând că diferențele finite Δt și respectiv ΔX devin foarte mici tinzând către diferențe infinitezimale, se poate considera că produsul $(\Delta X \cdot \Delta t)$ devine extrem de mic și deci poate fi neglijat în raport cu ceilalți termeni, astfel încât se poate scrie:

$$\mu \cdot X \cdot \Delta t \cdot V = \Delta X \cdot V + F \cdot X \cdot \Delta t ;$$

Împărțind prin $(V\Delta t)$ se obține:

$$\mu \cdot X = \frac{\Delta X}{\Delta t} + \frac{F \cdot X \cdot \Delta t}{V \cdot \Delta t} ;$$

Trecând la diferențe infinitezimale, se obține ecuația diferențială:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - \frac{F}{V} \cdot X$$

Notând cu $\frac{F}{V} = D \left[h^{-1} \right]$ viteza de diluție va fi:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D)X . \qquad (6.25)$$

Viteza de diluție D reprezintă numărul de volume reînnoite ale reactorului (alimentate și evacuate) în unitatea de timp (de exemplu, într-o oră). Astfel, dacă $\frac{F}{V} = D = 0{,}1$, înseamnă că într-o oră s-a eliminat (și alimentat) 1/10 din volumul de lucru.

Inversul vitezei de diluției D poartă numele de timp de staționare a celulelor în bioreactor și se măsoară în ore.

Se observă că, pentru a păstra constantă concentrația biomasei, este suficient ca: $\frac{dX}{dt} = 0$ și prin urmare:

$$\mu = D ,$$

aceasta fiind condiția de atingere a regimului staționar, adică viteza specifică de creștere a celulelor este egală cu viteza de diluție a mediului din bioreactor.

Modificarea concentrației celulelor din reactor poate fi făcută în două moduri:

- modificând pe μ (chemostat);
- modificând pe D (turbidistat).

Chemostatul. Tehnica cultivării în *chemostat* (Monod, 1949) constă în reglarea concentrației biomasei, prin intermediul concentrației substratului limitativ.

Scriind ecuația de bilanț de masă a substratului limitativ, pentru un interval de timp Δt, se obține:

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Substrat alimentat + Substrat existent =
= Substrat consumat + Substrat ieşit + Substrat rămas

Notând cu S_0 concentraţia substratului la alimentare, cu S concentraţia în reactor la momentul t şi cu $S + \Delta S$ concentraţia substratului la $t + \Delta t$, termenii ecuaţiei anterioare sunt:

- substrat alimentat: $F \cdot S_0 \cdot \Delta t$;
- substrat existent: $S \cdot V$;
- substrat consumat: $\Delta S \cdot V$ care se calculează astfel:

Conform ecuaţiei Monod:

$$(\Delta X)_C \cdot V = \mu \cdot X \cdot \Delta t \cdot V, \qquad (6.26)$$

Din relaţia de definiţie a randamentului:

$$Y_S = \frac{\Delta X}{-\Delta S} \Rightarrow \Delta X = Y_S \cdot \Delta S.$$

Înlocuind în ecuaţia (6.26) obţinem:

$$Y_S \cdot \Delta S \cdot V = \mu \cdot X \cdot \Delta t \cdot V \Rightarrow \Delta S \cdot V = \frac{\mu \cdot X \cdot \Delta t \cdot V}{Y_S},$$

care reprezintă expresia pentru substratul consumat în timpul Δt;

- substrat consumat: $\frac{\mu \cdot X \cdot \Delta t \cdot V}{Y_S}$;
- substrat ieşit: $(S + \Delta S) \cdot F \cdot \Delta t$;
- substrat rămas: $(S + \Delta S) \cdot V$.

Înlocuind în ecuaţia de bilanţ de masă, obţinem:

$$F \cdot S_0 \cdot \Delta t + S \cdot V = \frac{\mu \cdot X \cdot \Delta t \cdot V}{Y_S} + S \cdot F \cdot \Delta t + \underbrace{\Delta S \cdot F \cdot \Delta t}_{0} + S \cdot V + \Delta S \cdot V.$$

Împărţind cu $V \cdot \Delta t$ obţinem:

$$\frac{F}{V} \cdot S_0 = \frac{\mu \cdot X}{Y_S} + \frac{S \cdot F}{V} + \frac{\Delta S}{\Delta t}.$$

Notăm $\frac{F}{V} = D$ şi obţinem:

$$D \cdot S_0 = \frac{\mu \cdot X}{Y_S} + D \cdot S + \frac{\Delta S}{\Delta t} \text{ sau } D(S_0 - S) = \frac{\mu \cdot X}{Y_S} + \frac{\Delta S}{\Delta t}.$$

Trecând la limită, adică micşorând diferenţele finite până la valori infinitezimale, se obţine următoarea ecuaţie diferenţială:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu \cdot X}{Y_S};$$

BCU IAŞI / CONTRA UNIVERSITY LIBRARY

pentru regim staţionar: $\frac{dS}{dt} = 0$ şi atunci obţinem:

$$D(S_0 - S) = \frac{\mu \cdot X}{Y_S}. \tag{6.27}$$

Pentru a păstra constantă biomasa, $\mu = D$:

$$D(S_0 - S) = \frac{X \cdot D}{Y_S} \Rightarrow X = Y_S(S_0 - S).$$

Pe de altă parte:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_S + S} \Rightarrow D = \mu_m \cdot \frac{S}{K_S + S} \Rightarrow S; \quad S = \frac{K_S \cdot D}{\mu_m - D}.$$

Înlocuind S în expresia de definiţie a randamentului de substrat:

$$X = Y_S(S_0 - S), \tag{6.28}$$

obţinem în cazul regimului staţionar:

$$\overline{X} = Y_S\left(S_0 - \frac{K_S \cdot D}{\mu_m - D}\right), \tag{6.29}$$

unde: $\overline{X}$ este concentraţia de biomasă în condiţii staţionare ($\mu = D$).

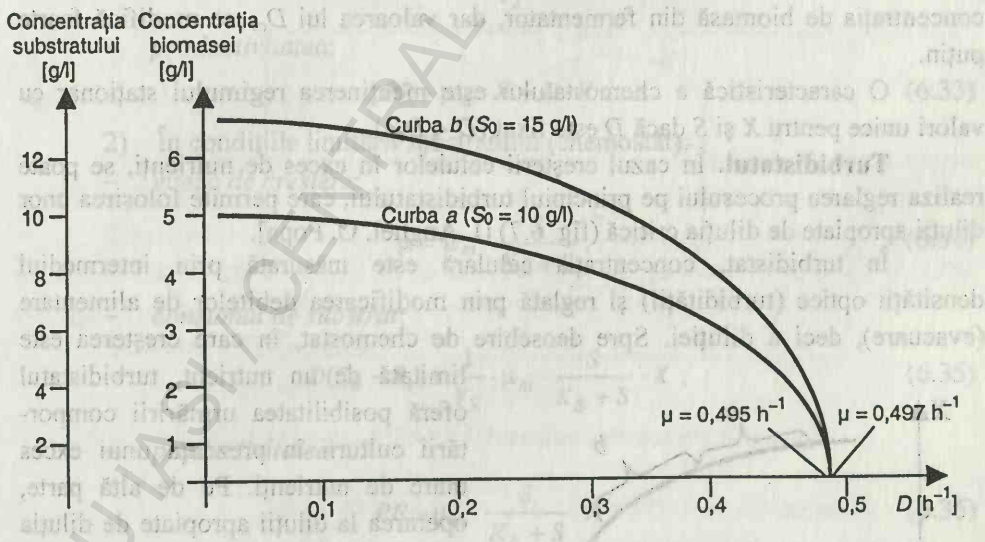


Fig. 6.6. Variaţia teoretică a concentraţiei biomasei, respectiv a substratului în funcţie de viteza de diluţie.

Reprezentând grafic $X = f(D)$ la diverse valori ale lui S_0, se pot trage următoarele concluzii (fig. 6.6) [I. Anghel, O. Popa]:

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

– $\mu_m = 0{,}05\ h^{-1}$ $X = 0{,}5\ g/g$

a) $S_0 = 10\ g/l$ $D_\mu = 0{,}495\ h^{-1}$;

b) $S_0 = 15\ g/l$ $D_\mu = 0{,}497\ h^{-1}$;

– la diluții mici (timpi de staționare mari), concentrația de biomasă la ieșire este practic insensibilă la variația diluției (critică), denumită și viteză de spălare;

– la diluții mari, concentrația de biomasă scade accentuat cu creșterea diluției; datorită duratelor de staționare mici, celulele nu se pot multiplica și doar o cantitate mică de substrat este consumată;

– există o valoare particulară a vitezei de diluție (critică):

$$D_{cr} = \mu_{max} \frac{S_0}{K_S + S_0}, \qquad (6.30)$$

pentru care concentrația substratului din reactor este egală cu cea din influent, ceea ce înseamnă că biomasa este eliminată din reactor.

D_{cr} se obține din ecuația lui $\overline{X}$, punând condiția:

$$\overline{X} = 0.$$

Ecuația (6.30) servește la determinarea lui μ_{max} în cultivare continuă:

– pe măsură ce concentrația substratului limitativ se mărește, crește și concentrația de biomasă din fermentator, dar valoarea lui D_{cr} se modifică foarte puțin.

O caracteristică a chemostatului este menținerea regimului staționar cu valori unice pentru X și S dacă D este fixat ($D < D_{cr}$).

Turbidistatul. În cazul creșterii celulelor în exces de nutrienți, se poate realiza reglarea procesului pe principiul turbidistatului, care permite folosirea unor diluții apropiate de diluția critică (fig. 6.7) [I. Anghel, O. Popa].

În turbidistat, concentrația celulară este măsurată prin intermediul densității optice (turbidității) și reglată prin modificarea debitelor de alimentare (evacuare), deci a diluției. Spre deosebire de chemostat, în care creșterea este limitată de un nutrient, turbidistatul oferă posibilitatea urmăririi comportării culturii în prezența unui exces mare de nutrienți. Pe de altă parte, operarea la diluții apropiate de diluția critică permite maximizarea productivității. Acest sistem nu asigură, însă, suficientă stabilitate stării staționare, fiind necesare modificări relativ mari ale debitelor pentru a obține menținerea concentrației.

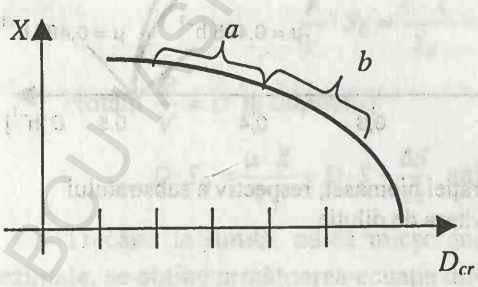


Fig. 6.7. Principiul turbidistatului:
a – domeniul chemostatului; *b* – domeniul turbidistatului.

Reglarea în cazul turbidistatului se face astfel: dacă concentrația celulară este prea mare, se vor mări debitele (diluțiile) pentru a se mări cantitatea de biomasă eliminată din bioreactor. Scăderea concentrației în biomasă este însă micşorată de apariția unui fenomen secundar: la creşterea debitului de alimentare creşte cantitatea de substrat limitativ introdusă în reactor şi deci concentrația acestuia se va mări; aceasta duce la creşterea lui μ conform ecuației Monod. Pentru a evita acest lucru, se procedează astfel: se utilizează două alimentări în loc de una; prima soluție conține toți nutrienții cu excepția substratului limitativ. Debitul ei, mult mai mare decât al soluției ce conține doar substratul limitativ, constituie elementul prin intermediul căruia se realizează reglarea. În acest fel se poate modifica diluția, păstrând constantă concentrația lui *S*.

În concluzie, pentru cultivarea în sistem continuu sunt valabile ecuațiile prezentate în cele ce urmează.

1) În condiții nelimitate ale concentrației de nutrienți (turbidistat):

– *viteza de creştere*:

$$\mu = \mu_m; \tag{6.31}$$

– *consumul de substrat*:

$$D(S_0 - S) = \frac{1}{Y_S} \cdot \mu_m \cdot X; \tag{6.32}$$

– *productivitatea*:

$$PR = \mu_m \cdot X = D \cdot X. \tag{6.33}$$

2) În condițiile limitării substratului (chemostat):

– *viteza de creştere*:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_S + S}; \tag{6.34}$$

– *consumul de substrat*:

$$D(S_0 - S_1) = \frac{1}{Y_S} \cdot \mu_m \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot X; \tag{6.35}$$

– *productivitatea*:

$$PR = \mu_m \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot X. \tag{6.36}$$

3) În condițiile limitării concentrației de oxigen dizolvat:

– *viteza de creştere*:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}}; \tag{6.37}$$

– *consumul de substrat*:

$$D(S_0 - S) = \frac{1}{Y_S} \cdot \mu_m \cdot \frac{C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}} \cdot X \; ; \tag{6.38}$$

– *productivitatea*:

$$PR = \mu_m \cdot \frac{C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}} \cdot X \; . \tag{6.39}$$

6.4.3. Bioreactorul cu recirculare externă

În unele cazuri, mediul de fermentație de la ieșirea din bioreactor este supus unei operații de separare (prin centrifugare, filtrare, sedimentare), iar concentratul conținând biomasa se recirculă parțial în bioreactor.

Ecuațiile ce guvernează acest proces se bazează pe aplicarea bilanțurilor de materiale pentru biomasă și substrat.

Notăm cu r raportul de recirculare și presupunem aceeași concentrație a substratului și a produsului în debitul de alimentare și în cel de evacuare.

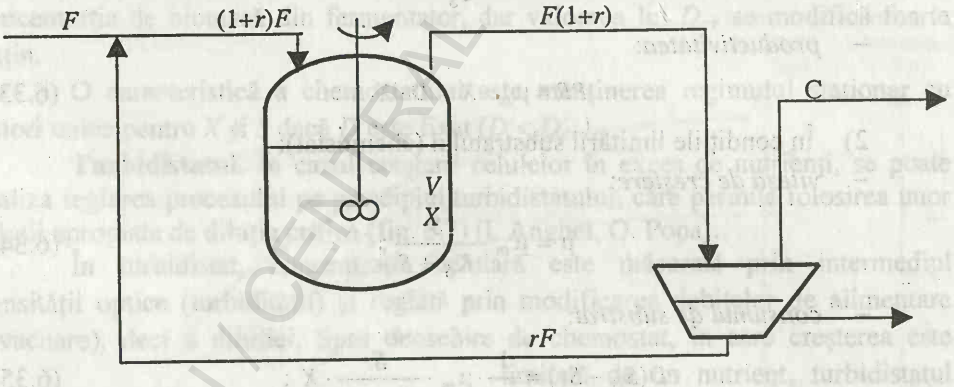


Fig. 6.8. Reprezentarea schematică a bioreactorului cu recirculare.

Bilanțul de materiale pentru biomasă se scrie astfel:

Biomasă intrată + Biomasă existentă + Biomasă generată =
= Biomasă rămasă + Biomasă ieșită.

Termenii ecuației de mai sus se calculează astfel:

I
- biomasă intrată: $rF \cdot \Delta t$;
- biomasă existentă: $V \cdot X$;
- biomasă generată: $\mu \cdot X \cdot V \cdot \Delta t$;

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II $\begin{cases} - & \text{biomasă rămasă: } (X+\Delta X)V; \\ - & \text{biomasă ieşită: } F(1+r)(X+\Delta X)\cdot\Delta t. \end{cases}$

Ecuaţia de bilanţ al biomasei:

$$rF\Delta t + VX + \mu X\cdot V\cdot\Delta t = (X+\Delta X)V + F(1+r)(X+\Delta X)\cdot\Delta t;$$

$$rF\cdot\Delta t + XV + \mu X\cdot V\cdot\Delta t = XV + V\cdot\Delta X + F(1+r)\cdot X\cdot\Delta t\cdot + \underbrace{F(1+r)\cdot\Delta X\cdot\Delta t}_{0};$$

$$[rF\Delta t + \mu XV\Delta t = \Delta X\cdot V + F(1+r)\Delta t\cdot X]:(V\cdot\Delta t);$$

$$r\cdot\frac{F}{V} + \mu X = \frac{\Delta X}{\Delta t} + \frac{F}{V}(1+r)\cdot X.$$

La limită:

$$\lim_{\Delta t\to 0}\frac{\Delta X}{\Delta t} = \frac{dX}{dt}; \qquad \frac{F}{V} = D;$$

$$r\cdot D + \mu X = \frac{dX}{dt} + D(1+r)\cdot X.$$

În condiţii staţionare: $\dfrac{dX}{dt} = 0$

$$r\cdot D + \mu X = D(1+r)\cdot X;$$

$$\mu = \frac{D[(1+r)X - r]}{X} = D\left[1 + r - \frac{r}{X}\right];$$

$$\mu = D\left[1 + r - \frac{r}{X}\right]. \qquad (6.40)$$

În cazul în care $r = 0$ (nu există recirculare), se obţine $\mu = D$, adică ecuaţia pentru regimul continuu, fără recirculare externă.

Din ecuaţia (6.40) se observă că $\mu < D$, deoarece $\mu = D\,(1+\ldots)$. Aceasta înseamnă că diluţia este mai mare decât viteza de creştere μ şi, deci, în cazul recirculării celulelor în bioreactor se poate lucra la diluţii mai mari.

Bilanţul substratului:

I $\begin{cases} - & \text{substrat intrat: } (FS_0 + rFS)\Delta t; \\ - & \text{substrat existent: } S\cdot V. \end{cases}$

Substratul consumat se calculează astfel:

$$\frac{\Delta X}{\Delta t} = \mu\cdot X; \qquad \Delta X = \mu X\Delta t;$$

$$Y_S = \frac{\Delta X}{\Delta S} \Rightarrow \Delta X = Y_S\cdot\Delta S;$$

$$\Delta S\cdot Y_S = \mu X\Delta t \Rightarrow \Delta S = \frac{1}{Y_S}\cdot\mu\cdot X\cdot\Delta t;$$

BCU ASTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II
- substrat consumat: $\frac{1}{Y_S}\cdot\mu\cdot X\cdot\Delta t\cdot V$;
- substrat rămas: $(S+\Delta S)V$;
- substrat ieşit: $F(1+r)\cdot(S+\Delta S)\cdot\Delta t$.

Ecuaţia de bilanţ pentru substrat se obţine astfel:

$$(FS_0+rFS)\Delta t+SV=\mu\cdot\frac{1}{Y_S}\cdot X\cdot\Delta t\cdot V+(S+\Delta S)V+F(1+r)(S+\Delta S)\cdot\Delta t;$$

$$FS_0\cdot\Delta t+rFS\cdot\Delta t+SV=\frac{\mu}{Y_S}\cdot X\cdot\Delta t\cdot V+SV+\Delta S\cdot V+F(1+r)S\cdot\Delta t+\underbrace{F(1+r)\Delta S\cdot\Delta t}_{0};$$

$$[FS_0\cdot\Delta t+rFS\Delta t=\frac{\mu}{Y_S}\cdot X\cdot\Delta t\cdot V+V\cdot\Delta S+F(1+r)S\cdot\Delta t]:V\Delta t;$$

$$\cdot\frac{F}{V}S_0+r\frac{F}{V}S=\frac{\mu}{Y_S}\cdot X+\frac{\Delta S}{\Delta t}+\frac{F}{V}(1+r)S;$$

$$\frac{F}{V}S_0+r\frac{F}{V}S=\frac{\mu}{Y_S}\cdot X+\frac{dS}{dt}+\frac{F}{V}\cdot S+\frac{F}{V}\cdot r\cdot S;$$

$$\frac{dS}{dt}=\frac{F}{V}(S_0-S)-\mu\frac{X}{Y_S};$$

$$\frac{F}{V}=D;\qquad\frac{dS}{dt}=0;$$

$$\frac{\mu X}{Y_S}=D(S_0-S). \tag{6.41}$$

Relaţia (6.41) este aceeaşi ca în cazul chemostatului.

6.4.4. Bioreactorul ideal cu deplasare (*D*) (curgere tip piston)

Reactoarele cu amestecare, operate discontinuu sau continuu sunt tipurile de bioreactoare cel mai frecvent întâlnite în biotehnologie.

Există însă situaţii în care se utilizează şi reactoarele tubulare (cu diametrul mult mai mic decât lungimea), acestea având următoarele avantaje:

- construcţie simplă, fără zone stagnante; în acest caz ridicarea la scară industrială se realizează mai uşor, fără riscuri;
- se poate regla durata de staţionare a celulelor în bioreactor, astfel încât conversia substratului să fie mai mare şi concentraţia produsului finit mai mare;
- spumarea este mai mică;
- eforturile de forfecare sunt mai mici, deci distrugerea pereţilor celulelor este mai mică.

Reactorul cu o curgere tip piston este caracterizat prin existența unui profil plan de viteze în secțiune perpendiculară pe direcția de deplasare a fluidului (axa reactorului). Aceasta este o idealizare, deoarece implică o amestecare radială infinită și lipsa amestecării axiale.

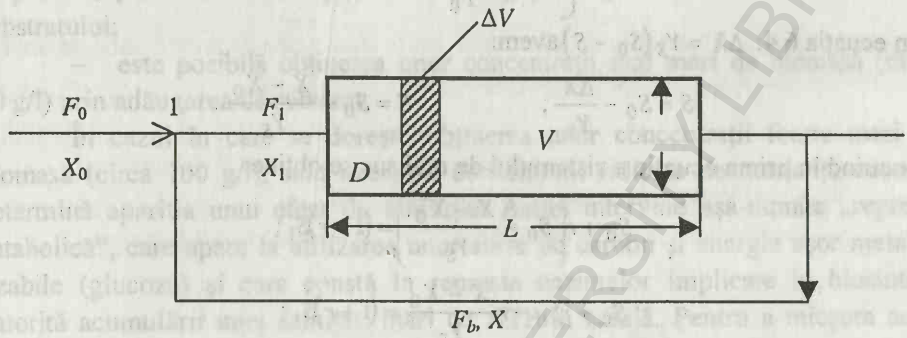


Fig. 6.9. Reprezentarea schematică a reactorului cu deplasare.

Ecuațiile caracteristice pentru acest tip de reactor se obțin din ecuațiile de bilanț de masă, scrise la nivelul unui element de reactor.

Notând cu F_0 debitul volumetric de mediu introdus în bioreactor și cu F_b debitul biomasei alimentate a cărei concentrație este X_b, se poate face un bilanț al masei celulare în punctul *1*:

$$\begin{cases} F_0 + F_b = F_1; \\ F_0 X_0 + F_b X = F_1 X_1 \end{cases}$$

Împărțind ambele ecuații cu F_0 și ținând seama că parametrul modelului este raportul de recirculare, $r = \frac{F_b}{F_0}$, se obține :

$$1 + r = \frac{F_1}{F_0};$$

$$X_0 + rX = \frac{F_1}{F_0} X_1;$$

$$X_0 + rX = (1 + r) X_1;$$

$$X_1 = \frac{X_0 + rX}{1 + r}.$$

Dacă scriem bilanțul pentru substrat:

$$\begin{cases} F_0 S_0 + F_b \cdot S = F_1 S_1 \\ F_0 + F_b = F_1. \end{cases}$$

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

Împărțim cu F_0 și notând $\frac{F_b}{F_0} = r$ – raportul de recirculare, obținem:

$$\begin{cases} S_0 + rS = (1+r)S_1 \\ 1 + r = \frac{F_1}{F_0}. \end{cases}$$

Din ecuația 6.4: $\Delta X = Y_S(S_0 - S)$ avem:

$$S = S_0 - \frac{\Delta X}{Y_S}; \qquad S = S_0 - \frac{X - X_0}{Y_S}.$$

Înlocuind în prima ecuație a sistemului de mai sus se obține:

$$S_0 + r\left(S_0 - \frac{X - X_0}{Y_S}\right) = (1+r)S_1;$$

$$S_0 + rS_0 - r\frac{X - X_0}{Y_S} = (1+r)S_1;$$

$$(1+r)S_0 - r\frac{X - X_0}{Y_S} = (1+r)S_1;$$

$$S_1 = S_0 - \frac{r}{1+r} \cdot \frac{X - X_0}{Y_S}. \qquad (6.42)$$

Concentrația în biomasă în reactorul ideal cu deplasare tip piston variază în funcție de diluție. De asemenea, concentrația inițială a microorganismelor influențează concentrația biomasei din bioreactor: cu cât X_0 este mai mic, cu atât timpul de staționare în reactor, necesar atingerii unei anumite concentrații, va crește.

6.4.5. Operarea bioreactoarelor în culturi extinse (cu adaosuri)

În afara modalităților de operare a bioreactoarelor, expuse anterior, în practica biotehnologică se folosește cu succes și tehnica adăugării în bioreactor a unuia sau a mai multor substraturi, în timpul cultivării, fără eliminare de biomasă (fermentație cu adaosuri), numită și cultură extinsă sau operare în sistem semicontinuu.

Acest tip de cultivare se situează între cultivarea „în șarjă" și cea continuă.

Caracteristicile celor trei tipuri de operare:

- *în șarjă*: concentrația substratului scade;
- *continuu*: concentrația substratului este constantă;
- *semicontinuu*: concentrația substratului se menține constantă o perioadă, după care scade.

Avantajele sistemului de operare semicontinuu sunt următoarele:

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

– prin alimentarea mediului în timpul cultivării se obţin rezultate superioare în productivitate faţă de sistemul discontinuu;

– în cazul în care se utilizează nutrienţi cu proprietăţi inhibitoare (metanol, etanol, acid acetic), prin menţinerea concentraţiei acestora între anumite limite se poate obţine o scurtare a perioadei de *lag* şi micşorarea efectului inhibitor al substratului;

– este posibilă obţinerea unor concentraţii mai mari de biomasă (circa 50 g/l) prin adăugarea de substrat.

În cazul în care se doreşte obţinerea unor concentraţii foarte mari de biomasă (circa 100 g/l), sunt necesare concentraţii ridicate de nutrienţi, ceea ce determină apariţia unui efect de inhibiţie. Astfel intervine aşa-numita „represie catabolică", care apare la utilizarea unor surse de carbon şi energie uşor metabolizabile (glucoză) şi care constă în represia enzimelor implicate în biosinteză datorită acumulării unei cantităţi mari de ATP în celulă. Pentru a micşora acest efect se adaugă treptat glucoza.

Ecuaţiile de bază în cazul culturilor semicontinue se obţin pornind de la bilanţul de masă.

Datorită alimentării fără evacuare, pe parcursul biosintezei are loc o mărire a volumului cu ΔV în timpul Δt.

Dacă facem următoarele notaţii: F – debitul de alimentare al substratului, F_b – debitul de alimentare cu o bază oarecare necesară corectării *p*H-ului; F_{as} – debitul de antispumant; F_{ev} – debitul apei evaporate (pentru culturi aerobe), atunci variaţia de volum va fi dată de relaţia:

$$\Delta V = F \cdot \Delta t + F_b \cdot \Delta t + F_{as} \cdot \Delta t - F_{ev} \cdot \Delta t .$$

Faţă de volumul total, volumul de bază şi volumul de antispumant sunt mici; de exemplu, volumul bazei < 0,1% pentru că se adaugă baze concentrate NH_3 25% sau NaOH 40%. Volumul de antispumant (ulei de floarea soarelui, ulei siliconic) este de circa 0,1%.

S-a constatat că la un debit de aer de 1 l aer/l mediu /min, la temperatură cuprinsă între 30...40°C, pierderile prin evaporare în decurs de 2 zile sunt de cca 4%.

În concluzie, faţă de volumul total se poate neglija termenul $(F_b + F_{as} - F_v)$ şi, în acest caz, variaţia volumului este dată de ecuaţia simplificată:

$$\Delta V = F \cdot \Delta t \text{ sau } F = \frac{\Delta V}{\Delta t} \text{ sau } F = \frac{dV}{dt} . \qquad (6.43)$$

Ecuaţia de bilanţ a biomasei se calculează cu relaţia:

Biomasă existentă + Biomasă generată = Biomasă rezultată

adică:

$$VX + \mu XV\Delta t = (V + \Delta V)(X + \Delta X) .$$

Efectuând operațiile obținem:

$$[VX + \mu XV\Delta t = VX + \underbrace{V\Delta X + X\Delta V}_{\Delta(VX)} + \underbrace{\Delta V \cdot \Delta X}_{0}] : \Delta t;$$

$$\mu VX = \frac{\Delta(VX)}{\Delta t}. \qquad (6.44)$$

La limită, atunci când diferențele finite tind către diferențe infinitezimale, se obține următoarea ecuație diferențială:

$$\frac{d(VX)}{dt} = \mu VX. \qquad (6.45)$$

Se scrie bilanțul de materiale pentru substrat:

Substrat intrat + Substrat existent = Substrat consumat + Substrat rămas

adică:

$$FS_0\Delta t + VS = \frac{\mu XV}{Y_S} \cdot \Delta t + (S + \Delta S)(V + \Delta V).$$

Procedând ca în cazul precedent, se obține succesiv:

$$[FS_0\Delta t + VS = \frac{\mu XV}{Y_S} \cdot \Delta t + SV + \underbrace{S\Delta V + V\Delta S}_{\Delta(VS)} + \underbrace{\Delta S \cdot \Delta V}_{0}] : \Delta t;$$

$$FS_0 = \frac{\mu XV}{Y_S} + \frac{\Delta(VS)}{\Delta t};$$

$$\lim \frac{\Delta(VS)}{\Delta t} = \frac{d(VS)}{dt};$$

$$\frac{d(VS)}{dt} = FS_0 - \frac{1}{Y_S} \cdot \frac{d(VX)}{dt}. \qquad (6.46)$$

Din ecuațiile (6.43) și (6.45):

$$\begin{cases} F = \dfrac{dV}{dt} \\ \dfrac{d(VX)}{dt} = \mu VX \end{cases}$$

Prin împărțire la V, se obține, succesiv:

$$\begin{cases} \dfrac{F}{V} = \dfrac{dV}{Vdt} \\ \dfrac{d(VX)}{V \cdot Xdt} = \mu^* \end{cases}$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Făcând notațiile: $\frac{F}{V} = D$ și $\frac{d(VX)}{VXdt} = \mu^*$ se obține:

$$\frac{XdV + VdX}{VXdt} = \mu^* \Rightarrow X\frac{dV}{Vdt} + \frac{dX}{dt} = X\mu^*;$$

$$XD + \frac{dX}{dt} = X\mu^* \Rightarrow \frac{dX}{dt} = X(\mu^* - D), \qquad (6.47)$$

unde μ^* reprezintă viteza specifică de creștere (h^{-1}) corectată pentru variația volumului.

Se observă că dacă $V = ct \Rightarrow \mu^* = \mu$.

Ecuația obținută este identică cu cea obținută pentru cultivarea continuă, dar deoarece V crește, D nu mai este constantă.

6.5. CONFIGURAȚIA BIOREACTOARELOR. TIPURI CONSTRUCTIVE

Bioreactorul este „inima" oricărei fermentații sau bioconversii enzimatice. Configurația și construcția unui bioreactor se realizează pe baza unor principii de inginerie bine fundamentate științific. Alegerea tipului de bioreactor este în strânsă legătură cu tipul bioprocesului ce urmează a se desfășura în el. Acest lucru presupune luarea unor decizii importante referitoare la următoarele aspecte:

– configurația bioreactorului: cu agitare mecanică sau un vas cu aerare fără agitare?

– mărimea bioreactorului: ce dimensiune a bioreactorului este necesară pentru a asigura producția rentabilă a produsului?

– condițiile bioprocesului din interiorul bioreactorului: *p*H, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat;

– sistemul de operare respectiv și dacă bioreactorul va funcționa în sistem discontinuu sau în sistem continuu? Va fi bioreactorul cuplat în serie cu alte bioreactoare sau va fi singur?

Decizia luată în legătură cu problemele enunțate anterior va avea un impact deosebit asupra performanței ulterioare a bioprocesului.

Bioreactoarele cilindrice cu sau fără agitare sunt cel mai des utilizate în biotehnologie.

Tipuri noi de bioreactoare au fost construite pentru aplicații speciale, cum ar fi: culturi de țesuturi vegetale sau animale și bioreactoare pentru celule imobilizate.

După natura proceselor biotehnologice, reactoarele pot fi clasificate în:

– reactoare biologice: în care se desfăşoară un proces de fermentaţie (cu biomasă);

– reactoare biochimice: în care se desfăşoară procesele enzimatice.

Reactoarele biologice pot fi pentru fermentaţii aerobe sau anaerobe.

Reactoarele biochimice pot fi: cu enzime libere, cu enzime imobilizate şi cu fază solidă.

Formele constructive şi modurile de operare ale bioreactoarelor pot fi foarte diferite, în funcţie de cerinţele şi specificaţiile proceselor tehnologice.

Reactoare pentru fermentaţii aerobe. După modul de introducere a energiei necesare amestecării fazei lichide (substrat + microorganisme) şi dispersării fazei gazoase (aer), reactoarele aerobe se pot diviza în trei categorii:

– cu amestecare mecanică;

– cu pompă de recirculare;

– cu aer comprimat.

În figurile 6.10 – 6.14 sunt prezentate cele trei categorii de bioreactoare.

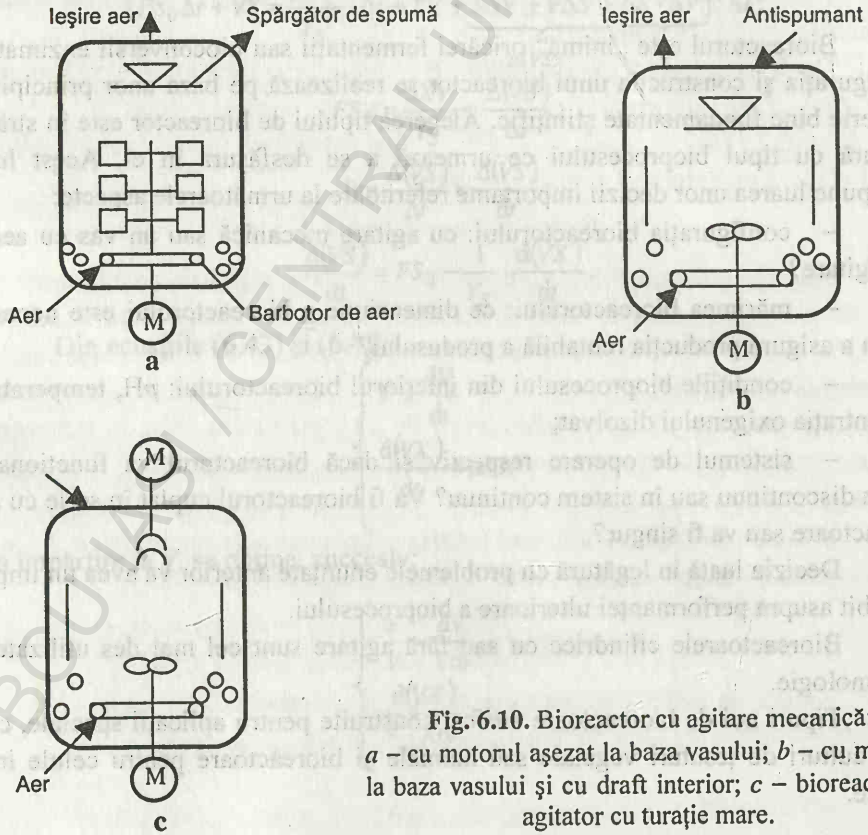


Fig. 6.10. Bioreactor cu agitare mecanică: *a* – cu motorul aşezat la baza vasului; *b* – cu motorul la baza vasului şi cu draft interior; *c* – bioreactor cu agitator cu turaţie mare.

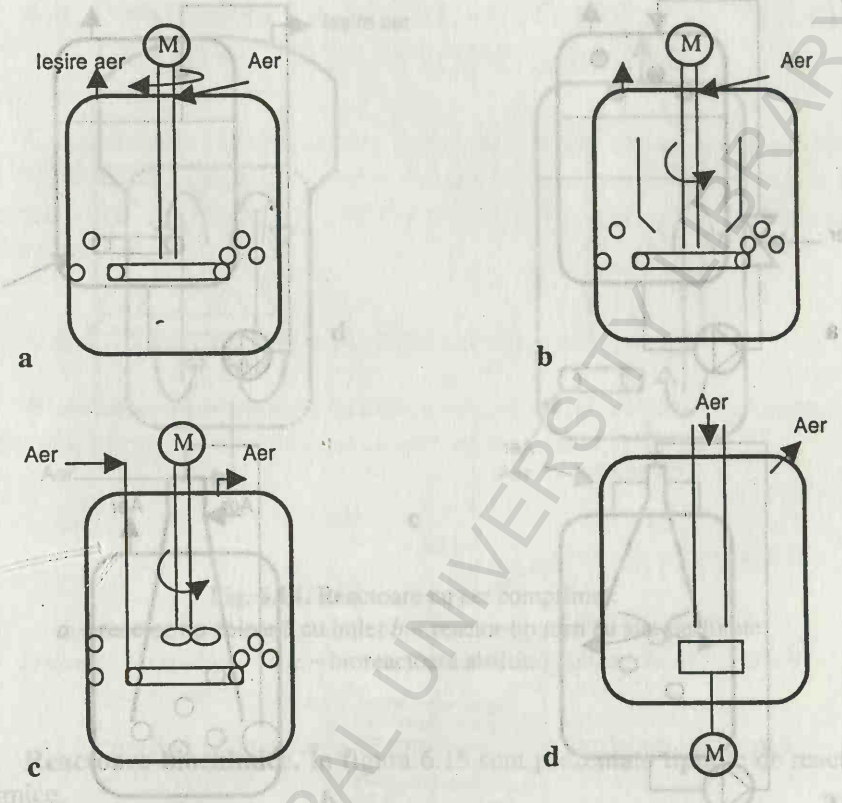


Fig. 6.11. Bioreactoare cu agitare mecanică cu barbotare de aer (prin axul agitatorului sau separat):
a, *b* – cu barbotare prin axul agitatorului; *c* – cu barbotor separat cu agitare sus; *d* – cu tub de aspirație a aerului.

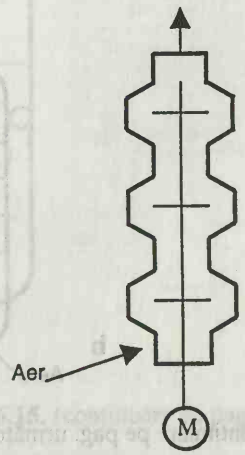


Fig. 6.12. Reactor cu agitare in mai multe stadii.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

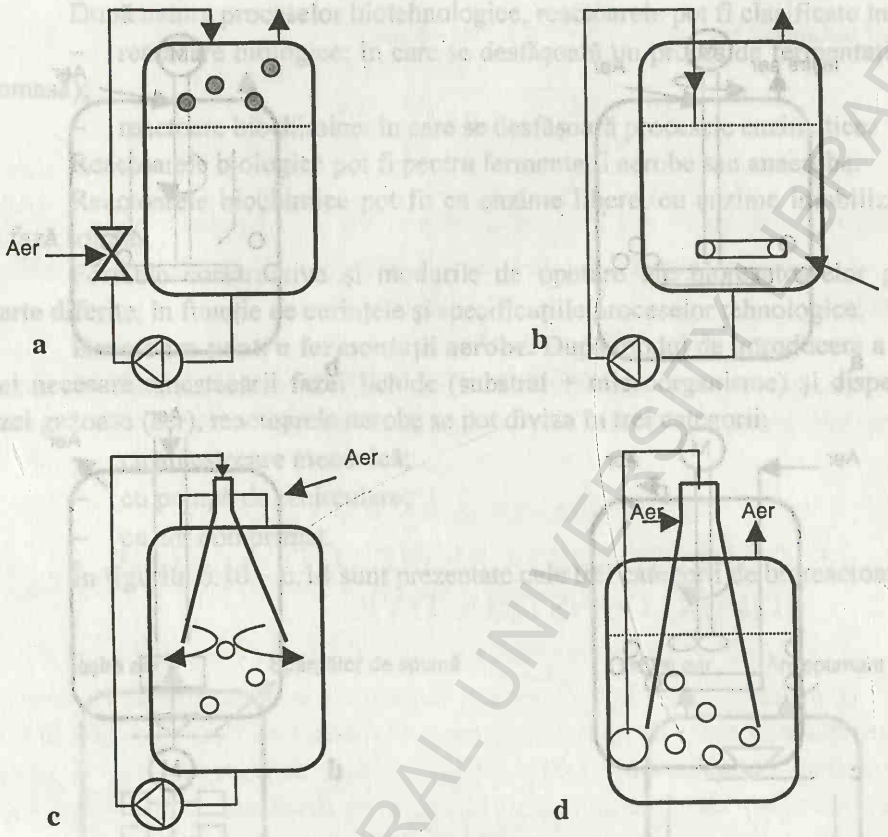


Fig. 6.13. Reactoare cu pompă de recirculare a fazei lichide:
a – cu recirculare externă; *b* – cu buclă de recirculare; *c* – cu recirculare cu jet;
d – cu recirculare internă (imersată).

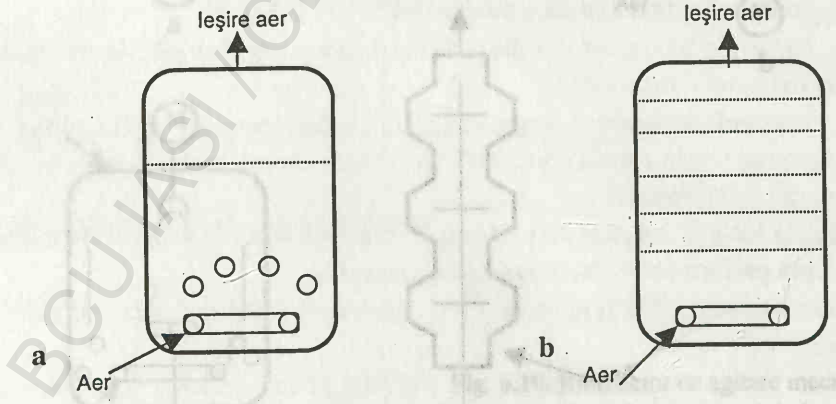


Fig. 6.14. (continuare pe pag. următoare).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

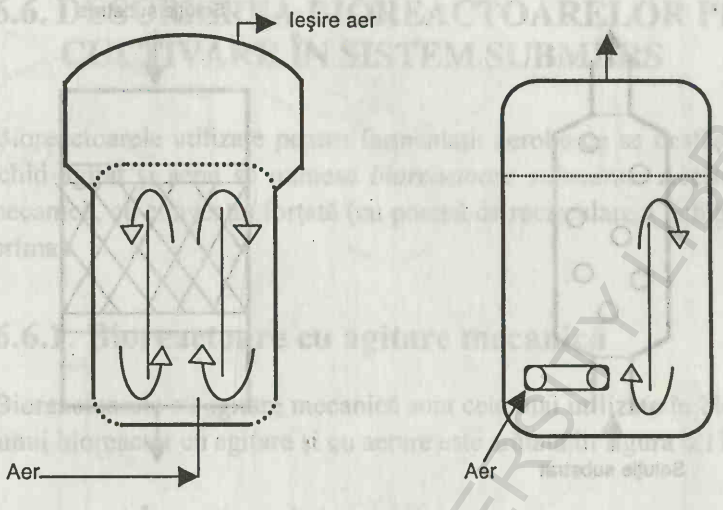


Fig. 6.14. Reactoare cu aer comprimat:
a – reactor tip coloană cu bule; *b* – reactor tip turn cu site perforate;
c – bioreactoare air-lift.

Reactoare biochimice. În figura 6.15 sunt prezentate tipurile de reactoare biochimice.

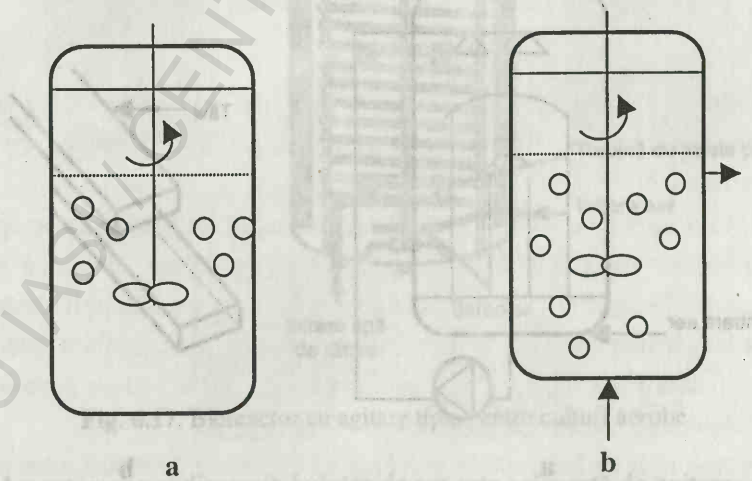


Fig. 6.15. (continuare pe pag. următoare).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

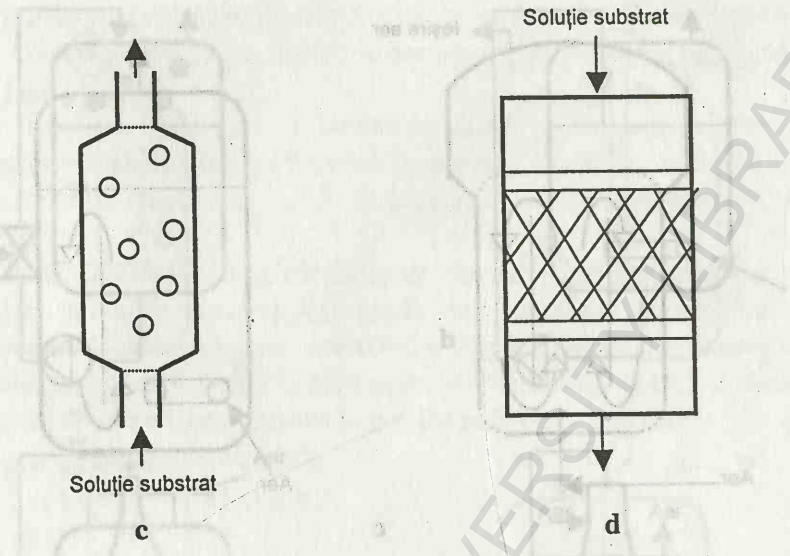


Fig. 6.15. Reactoare biochimice:
a – cu enzime libere, discontinuu; *b* – cu enzime libere, continuu;
c – în pat fluidizat (cu enzime libere); *d* – cu enzime imobilizare pe suport.

Alte tipuri constructive de reactoare sunt prezentate în figura 6.16.

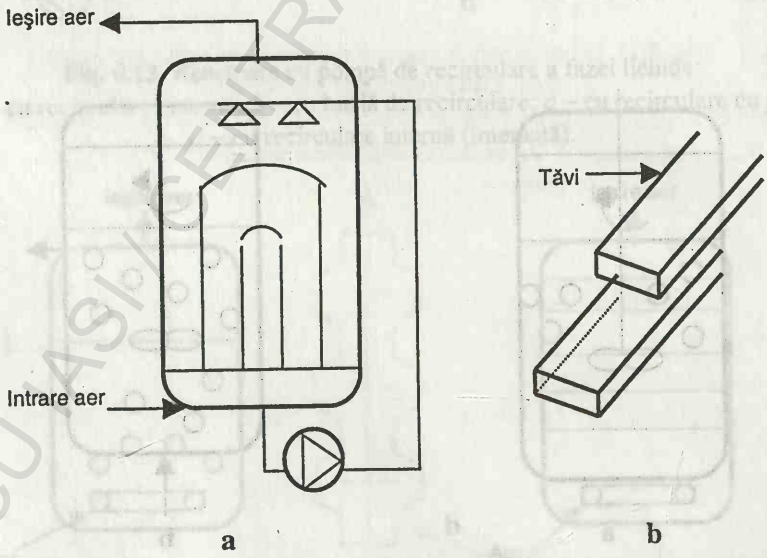


Fig. 6.16. Alte tipuri constructive de bioreactoare:
a – cu film de lichid; *b* – pentru culturi de suprafață.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6.6. DESCRIEREA BIOREACTOARELOR PENTRU CULTIVARE ÎN SISTEM SUBMERS

Bioreactoarele utilizate pentru fermentații aerobe ce se desfășoară într-un mediu lichid agitat și aerat se numesc *bioreactoare submerse*. Acestea pot fi cu agitare mecanică, cu convecție forțată (cu pompă de recirculare a lichidului) sau cu aer comprimat.

6.6.1. Bioreactoare cu agitare mecanică

Bioreactoarele cu agitare mecanică sunt cele mai utilizate în biotehnologie. Schema unui bioreactor cu agitare și cu aerare este arătată în figura 6.17.

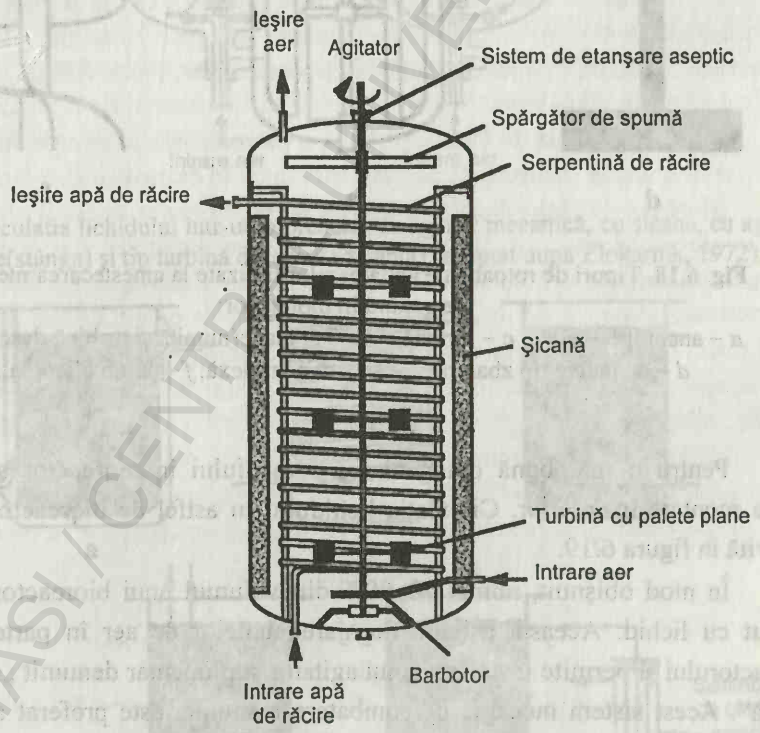


Fig. 6.17. Bioreactor cu agitare tipic pentru culturi aerobe.

Amestecarea și dispersia bulelor de aer este asigurată de agitarea mecanică; aceasta impune o anumită energie de agitare pe un nivel de volum și un anumit tip de agitator. Diferitele tipuri de agitatoare diferă între ele prin tipul și caracteristicile rotorului (fig. 6.18).

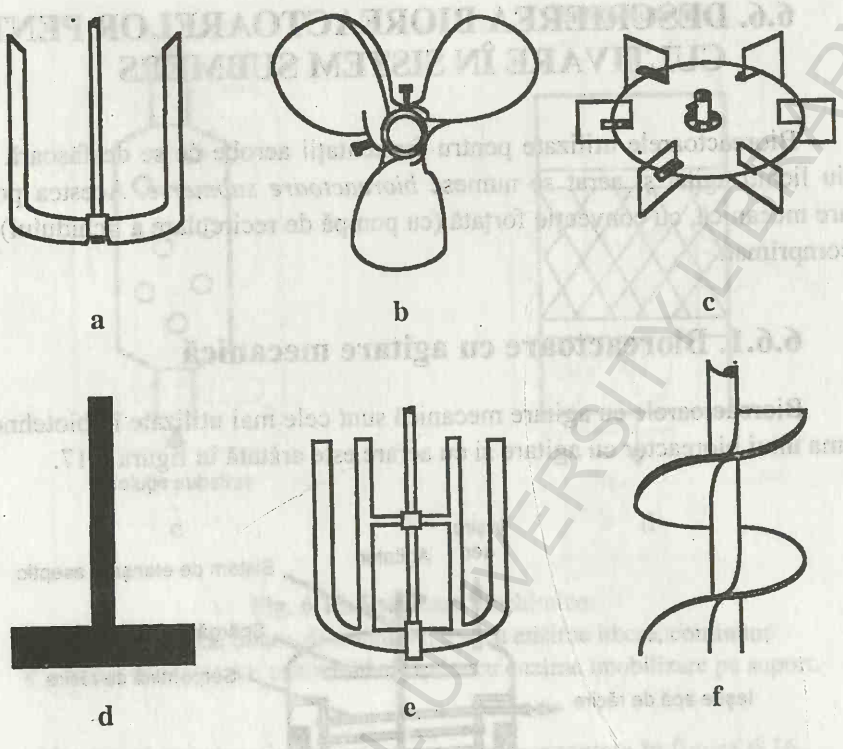


Fig. 6.18. Tipuri de rotoare ale agitatoarelor utilizate la amestecarea mediului de cultură în bioreactor:
a – ancoră; *b* – elice; *c* – turbină cu palete plane(numită şi turbină deschisă); *d* – cu palete tip zbatură; *e* – ancoră complexă; *f* – şurub elicoidal.

Pentru o mai bună omogenizare a mediului în bioreactor se utilizează şicane montate în interior. Circulaţia lichidului în astfel de bioreactoare poate fi urmărită în figura 6.19.

În mod obişnuit, numai 70–80% din volumul unui bioreactor agitat este umplut cu lichid. Aceasta asigură degajarea bulelor de aer în partea de sus a bioreactorului şi permite instalarea unui agitator suplimentar denumit „spărgător de spumă". Acest sistem mecanic de combatere a spumei este preferat adăugării de antispumanţi chimici care micşorează coeficientul de transfer al oxigenului. Viteza de agitare variază în funcţie de natura bioprodusului.

Bioreactorul cu agitare este prevăzut cu un sistem de răcire, care poate fi o serpentină internă. Există însă mai multe moduri de a prelua căldura de reacţie degajată în timpul fermentaţiei în bioreactor (fig. 6.20).

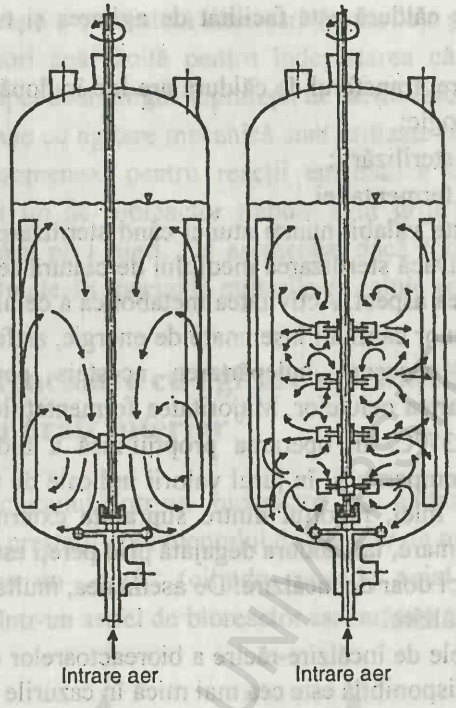


Fig. 6.19. Circulatia lichidului într-un bioreactor cu agitare mecanică, cu şicane, cu agitator tip elice(stânga) şi tip turbină deschisă (dreapta) (adaptat după Zlokarnik, 1972).

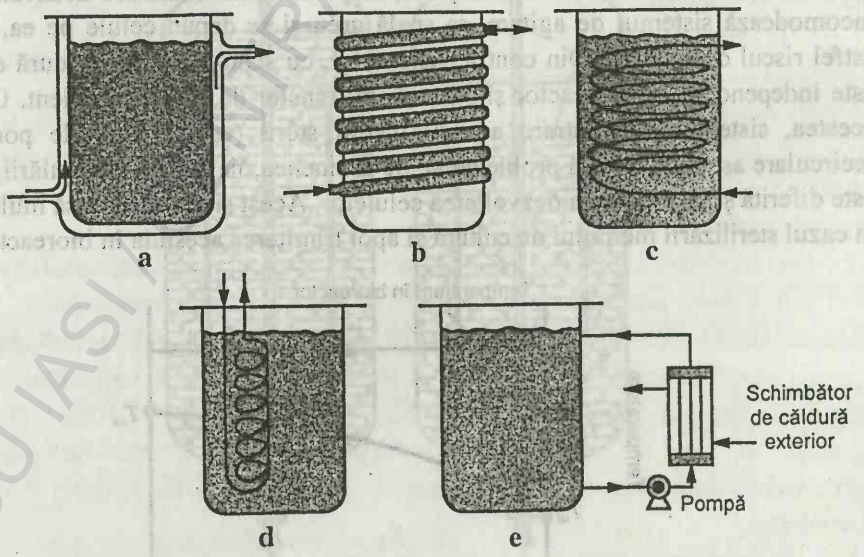


Fig. 6.20. Sisteme de încălzire-răcire a bioreactorului:
a – cu manta de încălzire-răcire; *b* – cu serpentină exterioară; *c* – cu serpentină interioară; *d* – cu serpentină interioară tip „şicană"; *e* – cu schimbător de căldură exterior.

BCU IASI

Transferul de căldură este facilitat de agitarea şi turbulenţa mediului de cultură.

În bioreactoare, transferul de căldură are loc în două ipostaze pe parcursul unui proces biotehnologic:

- în timpul sterilizării;
- în timpul fermentaţiei.

Primul caz este valabil numai atunci când sterilizarea mediului de cultură are loc în bioreactor. Dacă sterilizarea mediului de cultură se efectuează în alt vas, rămâne numai al doilea aspect. Activitatea metabolică a celulelor se desfăşoară, de obicei, cu degajarea unor cantităţi însemnate de energie, astfel încât, la majoritatea bioreactoarelor este necesară îndepărtarea acesteia pentru a nu produce supraîncălzirea şi moartea celulelor. Majoritatea fermentaţiilor au loc în intervalul de temperatură 30...37°C. În operarea propriu-zisă a bioreactoarelor se pune problema menţinerii temperaturii în jurul valorii indicate de tehnologia respectivă. Pentru bioreactoarele mici, raportul dintre suprafaţa externă a bioreactorului şi volumul acestuia este mare, iar căldura degajată prin pereţi este mare astfel încât nu este nevoie de răcire, ci doar de încălzire. De asemenea, multe reacţii enzimatice au nevoie de o uşoară încălzire.

Dintre sistemele de încălzire-răcire a bioreactoarelor expuse în figura 6.20, suprafaţa de transfer disponibilă este cea mai mică în cazurile *a* şi *b* faţă de cazul *c*.

Mantaua de răcire-încălzire asigură un bun transfer în cazul bioreactoarelor de laborator şi al altor bioreactoare de dimensiuni mai mici, dar sunt inadecvate pentru scară industrială. Pe de altă parte, serpentina interioară are dezavantajul că incomodează sistemul de agitare, se spală greu şi se depun celule pe ea, mărind astfel riscul de infecţie. Din contră, sistemul *e*, cu schimbător de căldură exterior, este independent de bioreactor şi asigură un transfer de căldură eficient. Cu toate acestea, sistemul de păstrare a unui mediu steril (este nevoie de pompe de recirculare aseptice) ridică probleme şi, de asemenea, în timpul recirculării, aeraţia este diferită şi poate afecta dezvoltarea celulelor. Acest sistem este însă mult folosit în cazul sterilizării mediului de cultură şi apoi trimiterea acestuia în bioreactor.

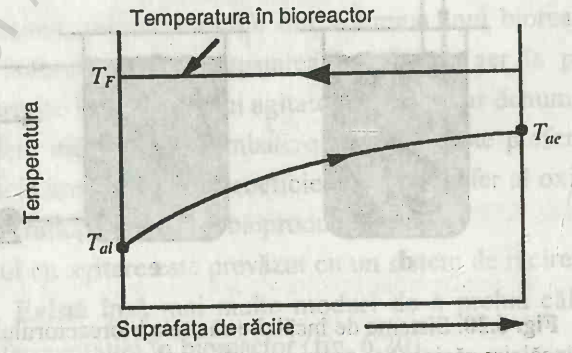


Fig. 6.21. Variaţia temperaturii apei de răcire în timpul fermentaţiei.

Când se foloseşte o serpentină interioară (cazurile *c* şi *d*), prin care trece un agent de răcire deseori apă răcită pentru îndepărtarea căldurii de fermentaţie, variaţia temperaturii apei de-a lungul suprafeţei de răcire este dată în figura 6.21.

Fermentatoarele cu agitare mecanică sunt utilizate pentru celule libere sau imobilizate şi, de asemenea, pentru reacţii enzimatice cu enzime libere sau imobilizate. La acest tip de bioreactor trebuie avut grijă ca celulele să nu fie distruse datorită agitării prea mari. De asemenea, dacă forţa de forfecare e prea mare, poate afecta celulele, în special în culturile de celule vegetale.

6.6.2. Bioreactoare cu agitare mecanică şi cu draft interior

Circulaţia lichidului într-un bioreactor cu agitare mecanică poate fi modificată (în sensul creşterii coeficientului de transfer de masă), dacă în interiorul acestuia se introduce un „draft" (cilindru metalic axial fără fund şi capac). Circulaţia lichidului într-un astfel de bioreactor este arătată în figura 6.22.

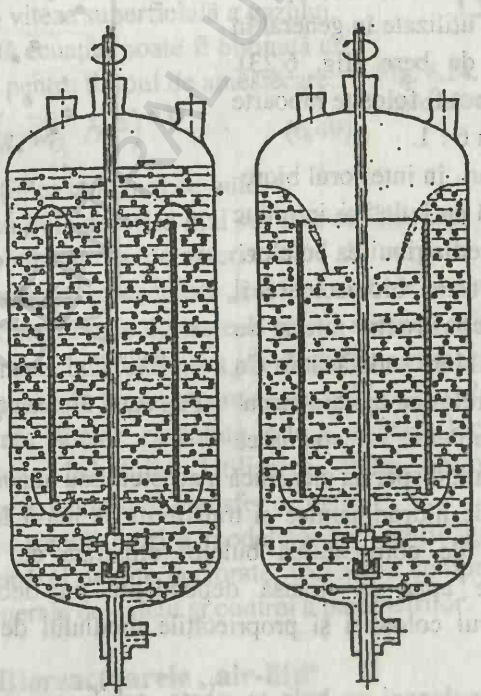


Fig. 6.22. Circulaţia lichidului în bioreactor cu draft complet imersat în lichidul de cultură (stânga) şi cu revărsare (dreapta). (Adaptat după Keitel, 1978.)

6.6.3. Bioreactoare cu aer comprimat

6.6.3.1. Bioreactoare tip „coloană cu bule"

O alternativă la bioreactoarele cu agitare mecanică o constituie bioreactoarele fără sistem de agitare mecanică. În aceste bioreactoare, agitarea mediului de cultură se realizează exclusiv prin barbotare de aer. Energia consumată este mai mică decât în cazul agitării mecanice. Aceste bioreactoare tip „coloană cu bule" se utilizează în industria drojdiei de bere, în industria berii, a vinului şi în tratarea apelor reziduale.

Din punct de vedere structural, bioreactoarele tip „coloană cu bule" sunt foarte simple, ele fiind, în general, vase cilindrice. În afară de barbotor, adică de sistemul de distribuţie a aerului în masa lichidă, pentru intrarea aerului comprimat, aceste bioreactoare nu mai au în general nimic în interior. Raportul înălţime : diametru, de aproximativ 3 : 1, este aplicat pentru bioreactoarele utilizate în general în producerea drojdiei de bere (fig. 6.23). Pentru alte aplicaţii, pot fi folosite rapoarte mai mari, de exemplu 6 : 1.

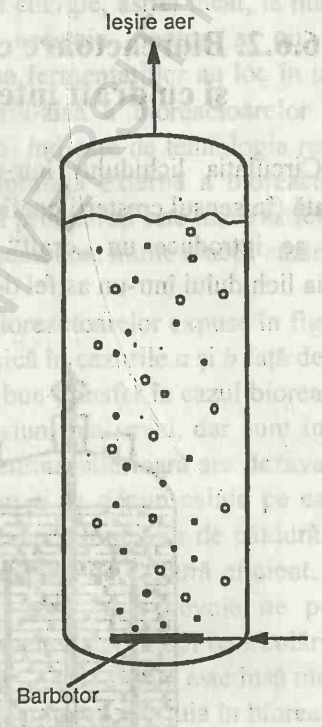


Fig. 6.23. Bioreactor tip coloană cu bule.

În unele cazuri, în interiorul bioreactorului tip „coloană cu bule" se introduc site perforate pentru redistribuirea bulelor.

Avantajul acestor bioreactoare îl constituie costul de construcţie mic şi de transfer de masă şi căldură satisfăcător. Ca şi în cazul bioreactoarelor cu agitare mecanică, pot apărea probleme cu spumarea mediului, fiind necesară dispersia mecanică a acesteia sau adaosul de antispumanţi.

Caracteristicile hidrodinamice şi transferul de masă în coloanele cu bule depind în întregime de comportarea bulelor eliberate de barbotor. Diferitele regimuri de curgere apar în strânsă dependenţă cu debitul de gaz, tipul barbotorului, diametrul coloanei şi proprietăţile mediului de cultură, cum ar fi vâscozitatea.

În interiorul coloanei cu bule se poate stabili un „regim omogen" dacă debitul de aer este mic şi distribuit uniform în coloană. În acest caz, bulele de gaz urcă cu aceeaşi viteză şi nu se amestecă între ele, iar agitarea lichidului este limitată.

În condiții normale de operare, dar la viteze mult mai mari ale gazului, în interiorul coloanei se creează o circulație haotică a celulelor, stabilindu-se un „regim eterogen" (ca în fig. 6.24).

În acest regim, bulele şi lichidul tind să se ridice prin centrul coloanei, în timp ce curentul de lichid care coboară se instalează pe lângă pereții bioreactorului. Circulația lichidului antrenează bulele şi astfel se produce o amestecare a aerului.

Timpul de amestecare în coloanele cu bule depinde de regimul de curgere. Pentru „regimul eterogen" s-a propus următoarea ecuație [Doran P., 1998]:

$$w_L = 0{,}9\left(g \cdot D \cdot w_G\right)^{0{,}33}, \qquad (6.48)$$

unde: w_L este viteza liniară de deplasare a lichidului; g – accelerația gravitațională; D – diametrul coloanei; w_G – viteza superficială a gazului.

Din această ecuație, poate fi obținută următoarea expresie pentru timpul de amestecare:

$$t_m = 11\frac{H}{D}\left(g \cdot w_G \cdot D^{-2}\right)^{-0{,}33}, \qquad (6.49)$$

în care H este înălțimea coloanei cu bule.

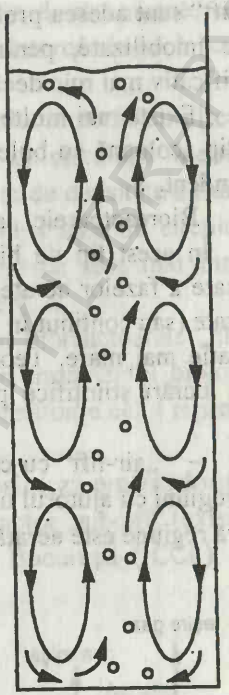


Fig. 6.24. Circulația fluidului într-o „coloană cu bule" aflată în „regim eterogen".

Coloana cu bule descrisă mai sus este considerată, în general, cu un singur stadiu. Pentru îmbunătățirea caracteristicilor de curgere şi amestecare, se construiesc adesea tipuri de bioreactoare „coloană cu bule" cu mai multe stadii:

- coloanele cu bule divizate în câteva secțiuni prin site perforate;
- coloane cu bule care sunt prevăzute cu amestecătoare locale.

În aceste tipuri de bioreactoare se pot cultiva *E. coli* şi drojdii.

Introducerea sitelor perforate sau a agitării locale reduce intensitatea amestecării axiale a lichidului. Utilizarea sitelor perforate duce la creşterea considerabilă a coeficientului de transfer de masă.

Datorită varietății mari a modelelor (diametrul găurilor, secțiunea transversală liberă, numărul de site perforate, varietatea compoziției mediilor) nu s-au elaborat relații generale de calcul şi control a parametrilor.

6.6.3.2. Bioreactoarele „air-lift"

Unul dintre cele mai utilizate tipuri de bioreactoare în biotehnologie este bioreactorului „air-lift". Ca şi cele de tip „coloană cu bule", amestecarea în interiorul mediului de cultură se realizează fără agitare mecanică. Bioreactoarele

„air-lift" sunt adesea preferate pentru culturi de celule vegetale sau animale sau de celule imobilizate, pentru că nivelul forfecării în acest tip de bioreactor este semnificativ mai mic decât în vasele agitate.

Există mai multe tipuri de bioreactoare „air-lift". Ele se diferențiază net de cele tip „coloană cu bule", datorită separării curentului de lichid ascendent de cel descendent.

Bioreactoarele „air-lift" sunt în unele cazuri sub forma unor turnuri cu buclă. În acest tip de bioreactor, circulația lichidului se datorează diferenței de densitate a fazelor aerate din turn și a zonelor neaerate. O diferență mai mare de densitate (sau conținut în gaz) și o înălțime mai mare a coloanei implică o viteză de circulație mai mare. Teoria de optimizare a reactoarelor „air-lift" este tratată în multe lucrări științifice publicate. În practică se utilizează câteva construcții de bază:

– „air-lift" cu circulație internă, în care caz reactorul turn este divizat în două regiuni cu ajutorul unui tub axial (numit draft) sau cu un plan vertical. Doar o singură regiune este aerată, cealaltă servind drept buclă (fig. 6.25, *a* și *b*);

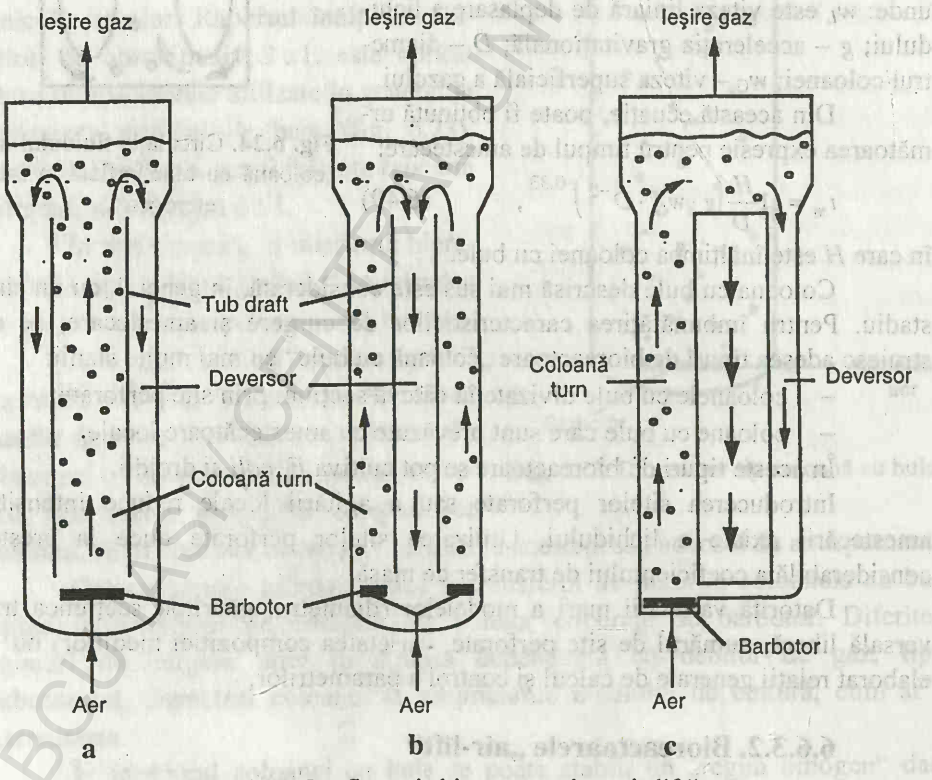


Fig. 6.25. Configurația bioreactoarelor „air-lift":
a, *b* – bioreactoare „air-lift" cu o singură regiune aerată;
c – bioreactor „air-lift" cu circulație externă.

– „air-lift" cu circulație externă, care constă din două coloane, cea cu diametru mai mare (turn) fiind aerată, fluxul de lichid întorcându-se în cea cu diametru mai mic (fig. 6.25, *c*)

Deoarece turnul și deversorul sunt separate în bioreactorul cu circulație externă, degajarea aerului este mai eficientă decât în cel cu circulație internă (cu buclă internă). Mai multe bule intră în deversor și diferența de densitate a fluidului din turn respectiv din deversor, este mai mare și astfel viteza de circulație a lichidului în vas este mai mare. În concluzie, amestecarea este mai bună în bioreactorul cu buclă externă decât în cel cu buclă interioară.

În general, amestecarea este oricum mai bună în bioreactoarele „air-lift" decât în cele tip „coloană cu bule". Din acest motiv în tratamentul biologic al nămolurilor se preferă bioreactoare de tip „air-lift", asemănătoare celui reprezentat în figura 6.26.

Bioreactoarele „air-lift" sunt mult utilizate în biosinteza proteinelor monocelulare utilizate în hrana animalelor. Un model de bioreactor „air-lift" (existent în cadrul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice Bucureşti (ICCF), secția Biosinteze) poate fi urmărit în figura 6.27.

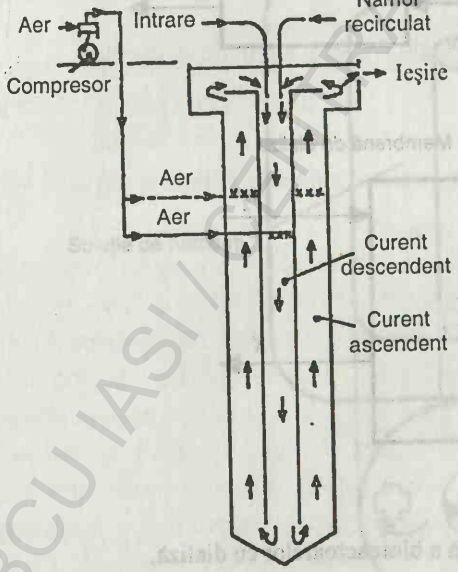


Fig. 6.26. Bioreactor „air-lift" pentru tratamentul nămolurilor. (Adaptat după Hines ș.a., 1975.)

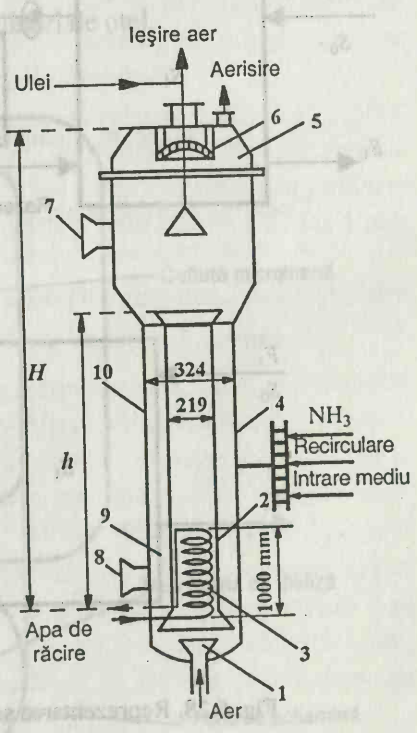


Fig. 6.27. Bioreactor „air-lift" cu serpentine de răcire utilizat în biosinteza proteinelor microbiene (existent la ICCF).

6.6.4. Bioreactoare cu dializă

Utilizarea membranelor de dializă în reactoarele biologice şi biochimice are două raţiuni:

– membranele de dializă sunt un mijloc eficient pentru îndepărtarea continuă a inhibitorilor sau a produselor toxice rezultate în timpul fermentaţiei;

– cultura microbiană poate fi alimentată cu substrat prin membrană.

În acest fel, se pot obţine concentraţii mari de microorganisme, deoarece substratul este separat de microorganism şi nu îl inhibă.

Bioreactoarele cu dializă sunt de mare importanţă pentru cultivarea celulelor umane, întrucât astfel pot fi îndepărtaţi produşii de inhibiţie, cum ar fi lactatul şi se poate aproviziona sistemul de celule umane cu soluţie de nutrienţi. De asemenea, sisteme de două sau mai multe tipuri de microorganisme pot fi cultivate în reactoare cu dializă.

Exemplificăm prin două tipuri de astfel de reactoare (fig. 6.28):

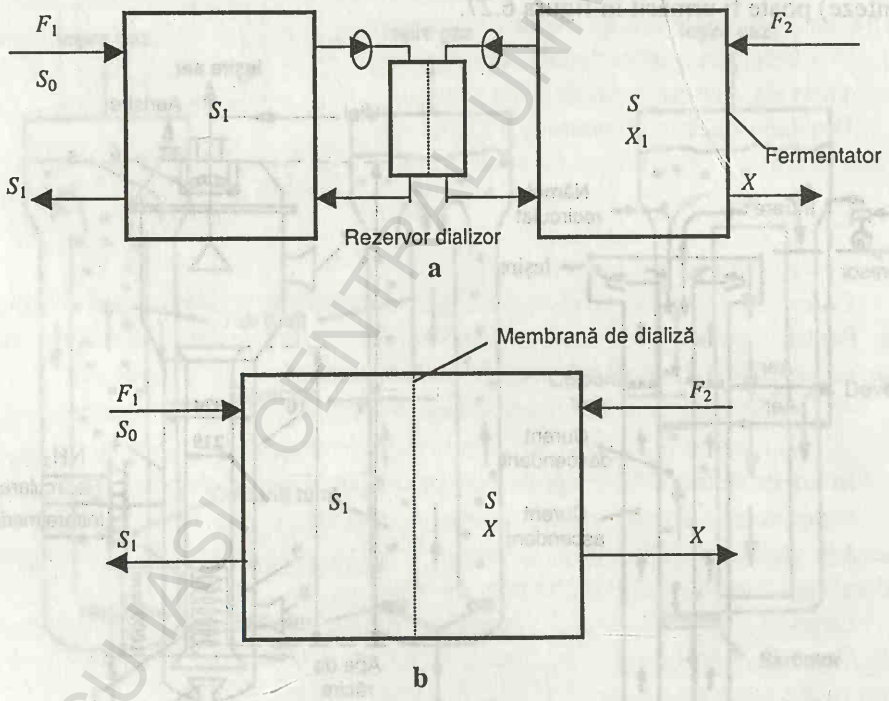


Fig. 6.28. Reprezentarea schematică a bioreactoarelor cu dializă.

Tipul *a* constă în două vase. Schimbul de substrat sau produs este efectuat prin pomparea conţinutului vasului printr-un modul de dializă separat. Se poate

utiliza un fermentator standard şi separat un modul de dializă. Acest sistem are o serie de dezavantaje. Astfel, sterilizarea acestui sistem multicomponent nu este fără probleme. Suspensia fermentată trebuie să fie pompată prin by-pass, unde este dificil să se controleze creşterea celulelor. Alimentarea cu nutrienţi şi gaze, descărcarea produselor metabolice şi stresul mecanic al celulelor viabile în timpul pompării constituie un neajuns. Din acest motiv se preferă tipul *b*.

Reactorul de tip *b* poate fi sterilizat *in situ* ca un fermentator obişnuit.

Principiul de funcţionare este simplu. Două tuburi flexibile sunt fixate de fund şi de capac, în interiorul bioreactorului de oţel (fig. 6.29).

Materialul din care este confecţionat tubul mare, care formează peretele fermentatorului, este din folie de poliamidă (grosimea porilor este de 80 μm). Al doilea tub mic formează un cilindru în interiorul reactorului. Acest al doilea tub este o membrană de dializă permeabilă, cu dimensiunea porilor de 20 μm.

Reactorul este echipat cu două unităţi de agitare, având motoare separate. Turaţia celor două motoare este controlată separat. Sistemul este foarte flexibil. Aeraţia poate fi instalată în ambele camere în acelaşi timp. Fermentatorul se sterilizează cu mediu, la 121°C, în mod obişnuit. În timpul sterilizării, pereţii din folie sunt protejaţi de o manta formată din doi cilindri de oţel.

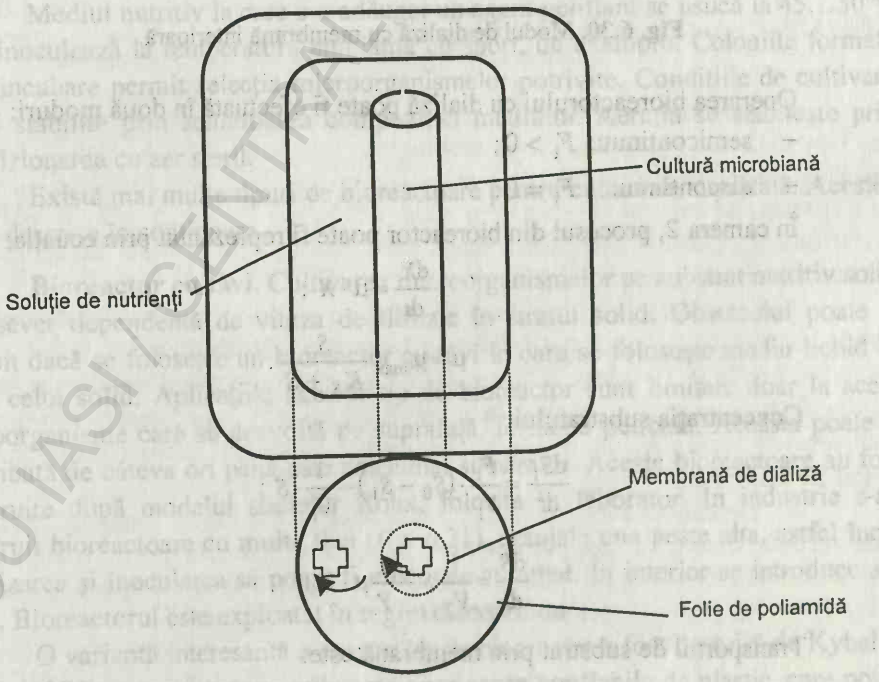


Fig. 6.29. Bioreactor cu dializă.

BCU IAŞI / CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

Modelarea matematică a procesului din bioreactorul cu dializă se poate efectua cu ajutorul ecuațiilor Monod prezentate anterior pentru alte tipuri de bioreactoare (fig. 6.30).

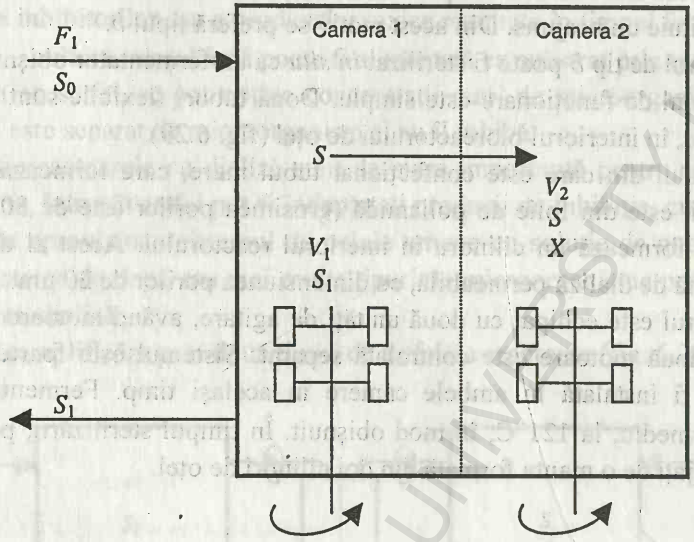


Fig. 6.30. Modul de dializă cu membrană interioară.

Operarea bioreactorului cu dializă poate fi efectuată în două moduri:

- semicontinuu: $F_1 > 0$;
- discontinuu: $F_1 = 0$.

În camera 2, procesul din bioreactor poate fi reprezentat prin ecuația:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X ;$$

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} .$$

Concentrația substratului:

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1}{V_1} \cdot (S_0 - S_1) - \frac{1}{V_1} \cdot S ;$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{V_2} S - \frac{1}{Y} \mu \cdot X . \qquad (6.50)$$

Transportul de substrat prin membrană este:

$$S = P \cdot A(S_1 - S), \qquad (6.51)$$

unde: A este suprafața membranei și P – coeficientul de permeabilitate al membranei.

6.7. BIOREACTOARE PENTRU CULTURI DE SUPRAFAȚĂ

Din punct de vedere istoric, reactoarele pentru culturi de suprafață au fost primele sisteme de fermentație utilizate. În timp ce pentru reactoarele submerse este nevoie de aprovizionarea continuă cu energie în scopul menținerii interfeței gaz-lichid, reactoarele pentru culturi de suprafață nu depind de sistemul exterior decât în mică măsură. Aceste bioreactoare sunt utilizate pentru microorganisme cultivate pe medii solide și semisolide, sau pe straturi lichide aflate în repaos.

Culturile microbiene pe substraturi nutritive solide sunt utilizate mai mult în laborator pentru întreținerea culturilor, decât industrial, pentru biosinteză.

În cazul culturilor de suprafață, microorganismele se dezvoltă pe suprafața unui suport lichid sau solid, iar în cazul culturilor solide, microorganismul se dezvoltă atât în suprafață cât și în interiorul mediului de cultură.

Mediul nutritiv la care s-a adăugat un agent gelifiant se usucă la 45...50°C și se inoculează la temperatura ambiantă cu spori, de exemplu. Coloniile formate după incubare permit selecția microorganismelor potrivite. Condițiile de cultivare pot fi stabilite prin schimbarea compoziției mediului. Aerația se stabilește prin aprovizionarea cu aer steril.

Există mai multe tipuri de bioreactoare pentru culturi de suprafață. Acestea vor fi descrise în continuare.

Bioreactor cu tăvi. Cultivarea microorganismelor pe substrat nutritiv solid este sever dependentă de viteza de difuzie în stratul solid. Obstacolul poate fi depășit dacă se folosește un bioreactor cu tăvi în care se folosește mediu lichid în locul celui solid. Aplicațiile acestui tip de bioreactor sunt limitate doar la acele microorganisme care se dezvoltă pe suprafață, formând peliculă. Aceasta poate fi schimbată de câteva ori până este consumat substratul. Aceste bioreactoare au fost construite după modelul sticlelor Roux, folosite în laborator. În industrie s-au construit bioreactoare cu multe tăvi (fig. 6.31), aranjate una peste alta, astfel încât sterilizarea și inocularea să poată fi efectuate automat. În interior se introduce aer steril. Bioreactorul este exploatat în regim discontinuu

O variantă interesantă a acestui tip de bioreactor a fost descrisă de Kybal și Vlcek (1976), care au propus utilizarea unor perne gonflabile de plastic, care pot fi umplute cu mediu nutritiv, inoculate și aerate prin tubul de fixare.

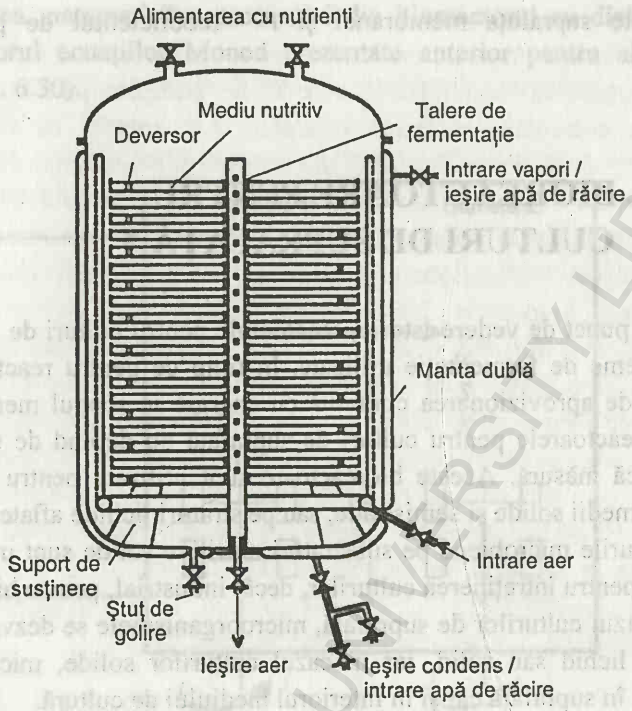


Fig. 6.31. Bioreactor cu tăvi, sterilizabil, cu răcire, cu alimentare pe la partea superioară.

Bioreactoare tip coloană cu umplutură. Aceste bioreactoare se folosesc cu biocatalizatori granulați sau imobilizați. Reactorul constă dintr-o coloană, verticală, umplută cu granule de biocatalizator. Aparatul este alimentat cu mediu prin partea de sus și formează o fază de lichid continuă printre particule. Deteriorarea celulelor, datorită frecării particulelor, este minimă comparativ cu bioreactoarele cu agitare.

Bioreactoarele cu umplutură se folosesc și pentru enzime imobilizate sau celule imobilizate (în acest caz fiind numite reactoare biochimice).

Transferul de masă dintre faza lichidă și catalizatorul solid este facilitat dacă viteza de trecere a acestuia prin coloană este mai mare. Pentru a îmbunătăți transferul de masă, de cele mai multe ori mediul lichid este recirculat așa cum este arătat în figura 6.32.

De asemenea, aerarea mediului este bine să fie făcută separat. Dacă aerul este barbotat direct, se produce coalescența bulelor, apar canale prin umplutură și distribuția nu este uniformă. Din același motiv, bioreactoarele cu umplutură nu sunt potrivite pentru bioprocesele din care rezultă CO_2 sau alte gaze.

Aerul circulă, de obicei, în contracurent cu lichidul pentru a intensifica înlăturarea căldurii degajate în timpul fermentației sau a reacției enzimatice.

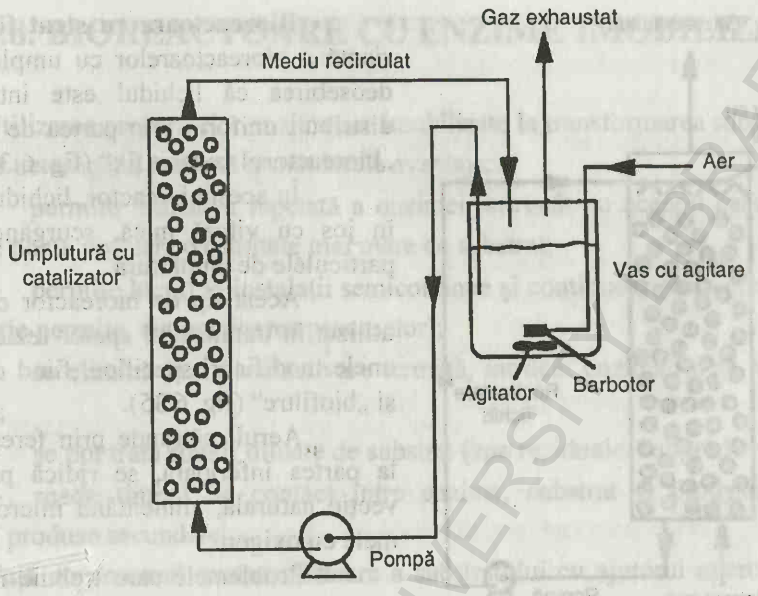


Fig. 6.32. Bioreactor tip „coloană cu umplutură" cu recircularea mediului.

Când se lucrează cu microorganisme, acestea formează un „film biologic" în jurul particulelor de umplutură.

Bioreactoare în strat fluidizat. În categoria reactoarelor de suprafață intră și reactoarele cu strat fluidizat.

Moebus (1981) descrie fermentația glucozei la etanol în strat fluidizat constând din granule de drojdie. Gazul de fluidizare păstrează în același timp granulele în mișcare și le usucă.

Când reactorul cu umplutură este operat cu stratul în suspensie, atunci el se numește „în pat fluidizat" sau „strat fluidizat" (fig. 6.33).

Aerul este introdus pe la partea de jos și menține în suspensie cultura de celule imobilizate sau de enzime imobilizate. Uneori se folosește nisip sau alt material care se amestecă cu celulele microbiene. Procedeul este uneori folosit cu microorganisme floculate, în fabricarea berii sau oțetului.

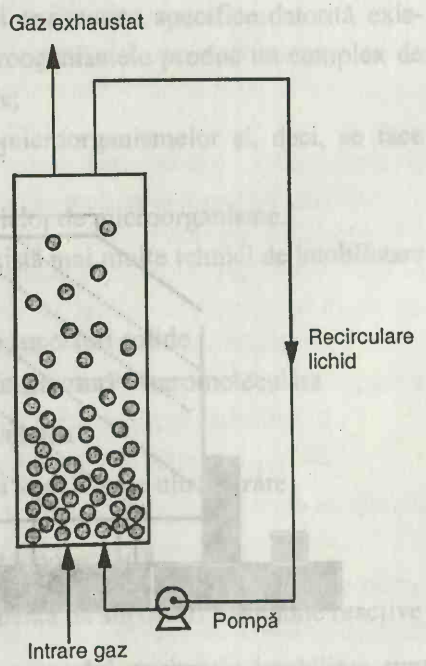


Fig. 6.33. Bioreactor în pat fluidizat.

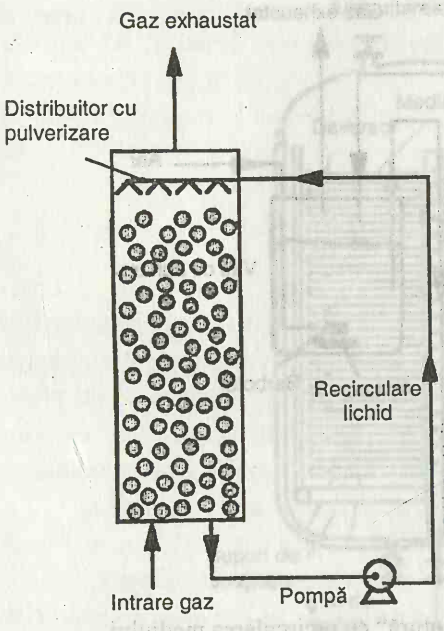


Fig. 6.34. Bioreactor cu strat fix.

Bioreactoare cu strat fix. O variantă a bioreactoarelor cu umplutură, cu deosebirea că lichidul este introdus şi distribuit uniform prin partea de sus, este „bioreactorul cu strat fix" (fig. 6.34).

În acest bioreactor, lichidul circulă în jos cu viteză mică, scurgându-se pe particulele de umplutură.

Acest tip de bioreactor este mult utilizat în tratamentul apelor reziduale, cu unele modificări specifice, fiind denumite şi „biofiltre" (fig. 6.35).

Aerul, pătrunde prin ferestrele de la partea inferioară, se ridică prin convecţie naturală, alimentând microorganismele cu oxigen.

Problemele care trebuie rezolvate pentru acest reactor sunt: utilizarea volumului reactorului în scopul creării unei interfeţe cât mai mari şi repartizarea uniformă a lichidului peste umplutură, pentru ca întreaga suprafaţă de lichid să lucreze uniform.

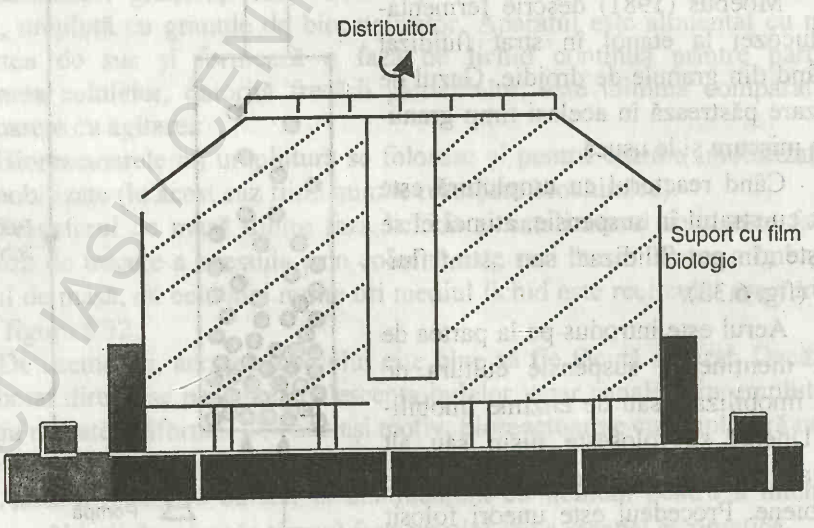


Fig. 6.35. Biofiltru utilizat la purificarea apelor reziduale.

6.8. BIOREACTOARE CU ENZIME IMOBILIZATE

Utilizarea preparatelor enzimatice imobilizate la transformarea substanțelor în cataliză heterogenă prezintă următoarele avantaje:

– permite utilizarea repetată a enzimei, întrucât cu aceeași cantitate de enzimă se poate prelucra o cantitate mai mare de substrat;

– permite lucrul în instalații semicontinue și continue (volum mic ocupat de instalație permite, automatizarea proceselor);

– se elimină faza de inactivare termică, întrucât enzima nu se regăsește în produs;

– se pot trata soluții diluate de substrat (ape reziduale, subproduse);

– scade timpul de contact între enzimă, substrat și produse; nu se formează produse secundare.

Față de procesul de transformare a substratului cu ajutorul microorganismelor (adică prin fermentație), procesele biochimice (adică cu ajutorul enzimei separate de sistem) prezintă următoarele avantaje:

– utilizarea pentru transformare a întregii cantități de substrat (în primul caz cel puțin 1% este folosit la dezvoltarea microorganismelor);

– posibilitatea efectuării unei reacții enzimatice specifice datorită existenței unei singure enzime; în primul caz microoganismele produc un complex de enzime, care poate duce la transformări paralele;

– se elimină fazele de cultivare a microorganismelor și, deci, se face economie de materii prime.

Există și posibilitatea imobilizării celulelor de microorganisme.

Tehnici de imobilizare a enzimei. Există mai multe tehnici de imobilizare a enzimei:

– procedee fizice
  – adsorbția pe suporturi solide
  – includerea în structuri macromoleculare
  – microîncapsularea
  – imobilizarea în celule de ultrafiltrare

– procedee chimice
  – reticulare intermoleculară
  – legarea covalentă de suporturi insolubile reactive

Caracteristicile de reactivitate ale preparatului enzimatic imobilizat sunt influențate de materialul utilizat ca suport prin: zona proceselor de difuziune din

imediata vecinătate a particulei de catalizator; modificarea sterică la centrii activi, geometria moleculară a suportului; flexibilitatea structurii sale, caracterul său hidrofil.

În timpul procesului de imobilizare, proteina enzimatică poate suferi unele modificări de conformație sau modificarea chimică a resturilor de aminoacizi, implicate în procesul de cuplare.

În procesul de imobilizare, o parte din activitatea enzimatică se pierde. Bilanțul de activitate este:

$$A_0 = A_1 + A_2 + A_3, \tag{6.52}$$

unde: A_0 este activitatea enzimatică inițială, în U/g;

A_1 – activitatea enzimatică regăsită în preparatul imobilizat, în U/g;

A_2 – activitatea enzimatică regăsită în mediul de cuplare;

A_3 – activitatea enzimatică pierdută în procesul de imobilizare.

Cauzele pierderii de activitate sunt următoarele:

– participarea la reacția de cuplare a unor resturi de aminoacizi din situsul catalitic;

– împiedicarea sterică a accesului substratului la centrii activi;

– modificările produse în conformația proteinei enzimatice;

– împiedicarea fenomenului de transport datorat difuziei.

Randamentul de imobilizare este:

$$\eta = 100 \cdot \frac{A_1}{A_0}. \tag{6.53}$$

Randamentul total de menținere a activității este:

$$\eta = 100 \cdot \frac{A_1 + A_2}{A_0}. \tag{6.54}$$

Cantitatea de proteină enzimatică cuplată la un suport variază între 1 mg proteină / g preparat imobilizat, până la 1 g proteină / g preparat imobilizat.

Reactivitatea preparatelor imobilizate este influențată de următorii factori:

– *granulometria* lor: activitatea specifică este adeseori invers proporțională cu diametrul mediu al particulelor;

– *masa moleculară* a substratului: difuziunea și împiedicările sterice limitează accesibilitatea substraturilor cu masă moleculară ridicată, la centrii activi ai catalizatorului enzimatic;

– *limitările difuzionale*

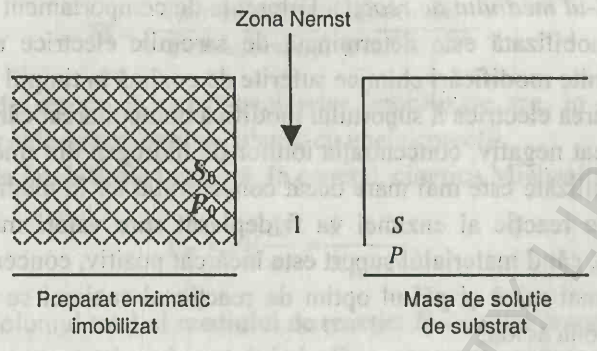


Fig. 6.36. Mecanismul de difuzie a substratului la enzima imobilizată. (Supă Oniscu, 1972.)

Procesele elementare implicate în transformarea substratului pentru catalizatorul enzimatic în stare liberă, respectiv imobilizată sunt:

– pentru enzima solubilă:

$$E + S \xrightarrow{K_m} ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P$$

– pentru preparat enzimatic imobilizat:

$$E + S_0 \xrightarrow{K'_m} ES \longrightarrow E + P_0$$

în care: S şi S_0 sunt concentraţiile de substrat în mediul de reacţie, respectiv în microvecinătatea catalizatorului; P şi P_0 – concentraţiile de produs în mediul de reacţie, respectiv în microvecinătatea catalizatorului.

Particulele de preparat enzimatic imobilizat sunt înconjurate de o zonă de solvent neagitată (zona Nernst) în care se stabilesc gradiente de concentraţie a substratului $S \rightarrow S_0$ şi a produsului $P_0 \rightarrow P$ (fig. 6.36). Saturarea catalizatorului enzimatic în faza solidă se produce la concentraţii de substrat mai mari decât în cazul enzimei solubile native; valoarea constantei lui Michaelis creşte de la K_m (pentru enzima solubilă) la K'_m (pentru preparatul imobilizat). Reducerea zonei neagitate prin metode fizice (măcinare, agitare energică) determină micşorarea acestor gradiente de concentraţii şi, deci, a diferenţelor dintre K_m şi K'_m.

Pentru viteza specifică superficială de reacţie se poate scrie relaţia:

$$v' = \frac{D}{l}(S - S_0) = \frac{v'_m \cdot S_0}{K_m + S_0}, \qquad (6.55)$$

unde: v' este viteza specifică superficială de reacţie, în moli/cm^2·s; D – coeficientul de difuziune al substratului; l – grosimea zonei neagitate; v'_m – viteza specifică superficială maximă de reacţie, în moli/cm^2·s; S, S_0 – concentraţia substratului în moli/cm^3;

– *pH-ul mediului de reacție*. Diferența de comportament a enzimei libere față de cea imobilizată este determinată de sarcinile electrice ale materialului-suport, de anumite modificări chimice suferite de enzimă în timpul cuplării.

Încărcarea electrică a suportului modifică comportarea: când materialul-suport este încărcat negativ, concentrația ionilor de hidrogen din imediata vecinătate a enzimei imobilizate este mai mare decât concentrația lor în mediul de reacție, iar *p*H-ul optim de reacție al enzimei va fi deplasat spre valori mai mari în zona alcalină. Invers, când materialul suport este încărcat pozitiv, concentrația ionilor de hidrogen este mai mică și *p*H-ul optim de reacție al enzimei se deplasează spre valori mici în zona acidă;

– *stabilitatea preparatelor enzimatice imobilizate*. De obicei, stabilitatea termică, stabilitatea la depozitare, stabilitatea față de denaturanți a enzimelor cresc prin imobilizarea acestora, în special la preparatele obținute prin cuplare covalentă. Sporul de stabilitate este determinat de faptul că, în urma imobilizării, structura conformațională a proteinei enzimatice este mai puțin sensibilă la acțiunea factorilor externi.

Elemente de calcul al reactoarelor cu enzime imobilizate. Reactoarele conținând preparate enzimatice imobilizate se clasifică în:

– discontinue cu agitare;
– continue cu agitare;
– continue de tip coloană;
– continue în pat fluidizat.

Alegerea tipului de reactor depinde de caracteristicile mecanice ale preparatului imobilizat, de capacitatea de producție a instalației, de natura substratului ce trebuie transformat.

Din punct de vedere al sistemului de calcul, se mențin tipurile ideale: cu amestecare totală sau flux tip piston.

Pentru reactoarele cu enzime imobilizate se calculează timpul de staționare definit astfel:

– pentru reactoarele discontinue:

$$TS = \frac{\text{Cantitatea de preparat imobilizat} \times \text{Timpul de reacție}}{\text{Volumul mediu de reacție}};$$

$$TS = \frac{\text{Activitatea enzimatică totală} \times \text{Timpul de reacție}}{\text{Volumul mediu de reacție}};$$

– pentru reactoarele continue:

$$TS = \frac{\text{Cantitatea de preparat imobilizat}}{\text{Debitul soluției de substrat}};$$

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$TS = \frac{\textit{Activitatea enzimatică totală}}{\textit{Debitul soluției de substrat}}.$$

Viteza de reacție în cazul enzimelor imobilizate are, în general, forme asemănătoare cu cele pentru enzima liberă, cu unele corecții.

Enzimele imobilizate respectă, în general, cinetica Michaelis-Menten.

$$v_R = -V\frac{dS}{dt} = \frac{k \cdot E \cdot S}{K_m + S}, \tag{6.56}$$

în care: V este volumul total al mediului de reacție; E – concentrația catalizatorului enzimatic; S – concentrația substratului; k, K_m – constante cinetice; t – timpul de reacție.

Activitatea preparatelor imobilizate descreşte, în timp, într-unul din următoarele moduri:

– inactivare de tip exponențial;

– inactivare dublă: în stadiile inițiale, moleculele de enzimă slab legate de catalizator sunt antrenate pe soluția de substrat; ulterior se produce o inactivare termică propriu-zisă;

– inactivare fizică, prin colmatarea porilor catalizatorului, eluarea enzimei din structura preparatului imobilizat, degradarea preparatului prin eroziune;

– inactivarea dependentă de concentrația substratului;

– în funcție de *p*H, prezența şi concentrația activatorilor sau inhibitorilor.

Efectul scăderii activității catalizatorului este scăderea conversiei substratului (fig. 6.37).

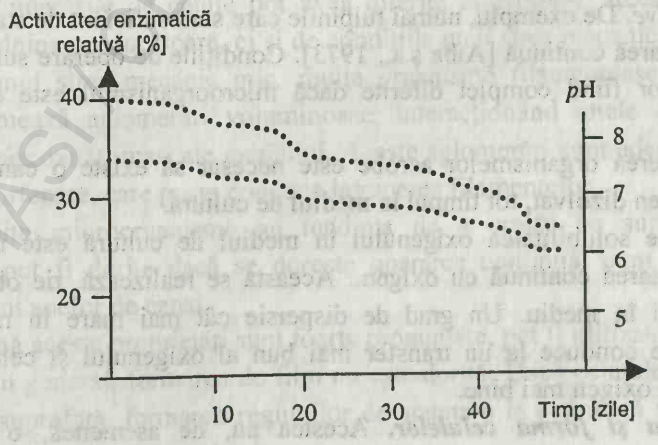


Fig. 6.37. Stabilitatea în timp a activității preparatului enzimatic imobilizat.

Pentru a evita scăderea producției, se cuplează mai multe reactoare în serie. De exemplu, se utilizează în acest scop o serie de trei reactoare exploatate astfel: la începutul reacției primului reactor al seriei este umplut cu catalizator proaspăt și parcurs de fluxul de substrat; pe măsura scăderii activității catalizatorului, în al doilea reactor al seriei se adaugă continuu catalizator proaspăt, în așa fel încât activitatea totală a sistemului să rămână constantă, iar fluxul de substrat parcurge ambele reactoare, cu același debit. Volumele reactoarelor sunt calculate în așa fel încât, atunci când al doilea reactor se umple cu catalizator, activitatea primului a devenit practic nulă. Începe adaosul de catalizator în al treilea, primul reactor al seriei se golește, fiind pregătit pentru un nou ciclu de funcționare. Astfel, tot timpul, debitul de substrat și raportul de conversie rămân constante.

Se pot utiliza și alte scheme:

- debit constant și conversie variabilă;
- reactoare legate în paralel (recomandabil la capacități mari).

6.9. ALEGEREA BIOREACTOARELOR

Alegerea bioreactorului potrivit pentru un anumit proces biotehnologic se realizează în funcție de o serie de factori predeterminați cum ar fi: natura microorganismului folosit, proprietățile mediului de cultură, parametrii biochimici ai procesului, amplasamentul bioreactorului.

Caracteristici determinate de natura microorganismului folosit în bioproces. Modul de operare al unui reactor depinde în mod esențial de *stabilitatea tulpinii productive*. De exemplu, numai tulpinile care sunt suficient de stabile pot fi utilizate în operarea continuă [Aiba ș.a., 1973]. Condițiile de operare sunt afectate în mod hotărâtor fiind complet diferite dacă microorganismul este *aerob* sau *anaerob*.

În creșterea organismelor aerobe este necesar să existe o cantitate disponibilă de oxigen dizolvat, tot timpul în mediul de cultură.

Deoarece solubilitatea oxigenului în mediul de cultură este mică, este necesară alimentarea continuă cu oxigen.. Aceasta se realizează, de obicei, prin dispersia aerului în mediu. Un grad de dispersie cât mai mare în mediile cu vâscozitate mare conduce la un transfer mai bun al oxigenului și celulele sunt aprovizionate cu oxigen mai bine.

Mărimea și forma celulelor. Acestea au, de asemenea, o influență considerabilă asupra tipului de reactor necesar și a modului de operare. Celulele

sferice sunt, de obicei, mai mici şi mai puţin sensibile la forfecare decât microorganismele filamentoase.

Formarea celulelor sferice necesită un grad de dispersie mai mare a aerului decât organismele filamentoase. Dimensiunile mici asigură un raport mare între suprafaţă şi volum, un consum mai mare al substratului şi, de asemenea, o creştere rapidă. Celulele aerobe cu viteză mare de creştere necesită un consum al oxigenului mai mare.

Organismele filamentoase cresc numai la capătul hifelor. Aceasta conduce la viteze mici de creştere şi la cereri mici în oxigen. Deoarece astfel de celule sunt, de cele mai multe ori, sensibile la forfecare, forţe mari de dispersie pot cauza ruperea. De fapt, este de dorit să se disperseze nu numai faza gazoasă ci şi microorganismul însuşi.

Formarea de micelii şi aglomerări are un efect considerabil asupra alegerii reactorului. Aglomerările de celule au un raport mic între suprafaţă şi volum, o viteză mică de consum a substratului şi o viteză mică de creştere.

Viteza mică de consum a oxigenului permite folosirea reactoarelor care dispersează aerul într-un grad mic sau moderat.

Celulele care formează aglomerări sunt uşor de separat din mediile de cultură şi reintroduse în reactor în scopul ridicării densităţii celulare. În multe reactoare, densitatea celulară se diminuează considerabil cu creşterea înălţimii (de exemplu, reactoarele turn). Când ieşirea mediului este plasată la capătul reactorului, numai o cantitate mică de celule sunt îndepărtate din turn. În acest fel, timpul de staţionare a celulelor în reactor poate fi extins considerabil, fără creşterea timpului de staţionare în mediu. Deci, aglomerarea de celule permite operarea în sistem continuu a reactorului de producere a metaboliţilor, fără o separare specială a celulelor (de exemplu, prin centrifugare sau filtrare).

Aglomerările de celule pot avea diferite morfologii. Acestea depind nu numai de tulpina producătoare, ci şi de condiţiile unui stres mecanic din reactor. În condiţiile unui stres mecanic mic, multe organisme filamentoase (de exemplu, fungii) formează aglomerări voluminoase, interacţionând unele cu altele, care conduc la vâscozităţi mari ale mediului. Aceste aglomerări sunt adesea sensibile la stresul de forfecare, care poate conduce la ruperea filamentelor.

Multe microorganisme au tendinţa de a creşte pe suprafeţe. Aceste proprietăţi pot fi dorite dacă se doreşte operarea continuă, cum ar fi în cazul tratamentului apelor de canal.

Dacă aceste proprietăţi sunt foarte pronunţate, pot fi utilizate reactoarele de suprafaţă. În general, formarea de film nu este dorită. Dacă celulele au tendinţa să crească la suprafaţă, formarea regiunilor de stagnare la suprafaţă poate fi evitată prin utilizarea unui reactor potrivit.

Caracteristici ale reactoarelor determinate de proprietăţile mediului de cultură. Caracteristicile mediilor de cultură determină alegerea unui anumit tip de bioreactor.

Proprietăţile fizice ale substratului folosit diferă: gazos (de exemplu, metan, dioxid de carbon, la fotosinteză), lichid şi solubil în apă (de exemplu, glucoză, lactoză), lichid şi insolubil în apă (de exemplu, parafine), solid şi insolubil în apă (de exemplu, amidon, celuloză). Fiecare stare fizică exercită o influenţă considerabilă în alegerea bioreactorului. De aceea, de exemplu, metanul şi aerul pot forma un amestec exploziv şi reactoarele cu acest amestec nu pot fi folosite.

În cazul substraturilor volatile, se alege un reactor cu debit în contracurent, cu agitare uşoară axială sau un sistem de reactoare cu mai multe stagii pentru a micşora pierderile de gaz. S-a studiat, de asemenea, aeraţia emulsiilor de ulei în apă. Prezenţa parafinelor reduce viteza de transfer a oxigenului. În general, reactoarele de suprafaţă nu sunt potrivite pentru fermentaţia emulsiilor uleioase.

Dacă se utilizează un substrat solubil în apă, în operarea discontinuă, se obţine, de obicei, un mediu mult mai vâscos decât cel iniţial. Pentru acest caz se folosesc reactoare speciale cu agitatoare elicoidale. Prezenţa solidelor grele (de exemplu carbonatul de calciu în mediul de cultură pentru *Penicillum chrysogenum*) ori a substraturilor fibroase (de exemplu, paie pretratate) limitează alegerea tipului de bioreactor. Fibrele lungi din suspensiile diluate micşorează debitul şi particulele mari blochează intrările. În acest caz este necesară introducerea de restricţii la prepararea mediilor; se prevăd faze speciale de înlăturare a neajunsurilor.

O altă componentă a mediului care poate influenţa tipul de bioreactor ce urmează a fi utilizat este concentraţia de substrat sau de produs finit.

Efectul biocinetic al substratului sau al produsului pot să afecteze alegerea bioreactorului. În cazul în care substratul prezintă inhibiţie sau represie asupra creşterii microorganismului, procesul este condus în sistem semicontinuu, cu alimentare continuă de substrat (fermentaţie cu adaosuri).

În cazul în care produsul de biosinteză induce inhibiţie sau represie când sunt în concentraţie mare (de exemplu, glucoza şi celobioza la *Trichoderma viride*, etanolul la *Sacharomyces cerevisiae*), este de dorit să se folosească aranjamentul în mai multe trepte.

O altă caracteristică, ce influenţează alegerea unui anumit tip de bioreactor sau a unui anumit sistem de operare, o constituie prezenţa în mediul de cultură a unei componente care se degradează în timpul operaţiei de sterilizare (termolabile). În acest caz este necesară sterilizarea separată a acestor materiale.

O altă proprietate a mediului de cultură care influenţează procesul de fermentaţie este tendinţa de coalescenţă, adică formarea de bule de gaz care micşorează transferul de oxigen în mediul de cultură. În acest caz se introduc în bioreactor sisteme de disipare a bulelor, cu efect local (mijloace mecanice).

Comportarea reologică a mediului are o mare influenţă asupra unui bioproces. Mediile cu vâscozitate mică nu creează probleme de agitare şi de viteză de transfer a oxigenului. O creştere a vâscozităţii mediului poate avea diferite cauze:

– concentraţia mare în substrat (în particular la operarea în sistem „batch", la începutul cultivării);

– secreţia de produse vâscoase pe parcursul biosintezei, cum ar fi pullulanul şi xantanul;

– morfologia microorganismului.

O caracteristică a mediului importantă, care implică alegerea unui anumit tip de bioreactor, este spumarea în timpul cultivării. Formarea de spumă conduce de cele mai multe ori la blocarea ieşirii aerului, inundarea filtrelor de aer, scăderea volumului de mediu în bioreactor, infecţia mediului de cultură şi, deci, compromiterea procesului de biosinteză.

Există mai multe metode pentru prevenirea fenomenului de spumare:

– conducerea procesului astfel încât să nu se formeze spumă; de exemplu o viteză mare de transfer a oxigenului (printr-o agitare corespunzătoare, variabilă în funcţie de nivelul concentraţiei de oxigen dizolvat măsurată continuu) transformă procesul într-unul cu limitare de substrat; în acest caz concentraţia oxigenului nu mai este un factor limitativ şi nu este necesară mărirea debitului de aer care conduce la spumare excesivă. Această metodă se poate aplica în cazul în care spumarea se datorează proteinelor dizolvate, eliberate din celulele lizate;

– adăugarea de antispumanţi, care schimbă coalescenţa mediului. Agentul antispumant se acumulează la interfaţa gaz-lichid şi împiedică formarea spumei.

Antispumanţii utilizaţi în industria de biosinteze sunt :

– uleiuri naturale: de soia, de floarea-soarelui;
– uleiuri sintetice, care pot fi de natură siliconică sau polimeri organici;
– mijloace mecanice: agitatoare cu turaţie mare, şicane, tuburi interioare.

Spumarea poate fi combătută şi prin alegerea tipului de bioreactor potrivit care să permită o circulaţie rapidă a lichidului fără să formeze spumă (bioreactor cu „draft" interior).

7. PRELUCRAREA MEDIILOR DE CULTURĂ ÎN SCOPUL IZOLĂRII ŞI PURIFICĂRII PRODUSELOR DE BIOSINTEZĂ

Înainte de a fi purificate, substanţele organice obţinute pe cale biotehnologică sunt în prealabil izolate din lichidul de cultură (dacă sunt extracelulare) sau din biomasă (dacă sunt intracelulare) într-o formă parţial purificată, aplicând metode de separare general valabile pentru toate produsele de biosinteză.

Prelucrarea primară a mediilor de biosinteză cuprinde operaţii aplicate, în general, în tehnologia chimică cum ar fi: filtrarea, centrifugarea, decantarea, concentrarea fazei lichide, dezagregarea celulelor, extracţia, uscarea, atomizarea. Se aplică, de asemenea, în procesele mai specifice cum ar fi: precipitarea cu solvenţi sau cu săruri anorganice, purificări şi concentrări prin ultrafiltrare.

Echipamentele industriale implicate sunt complexe şi specifice. Schema de flux variază de la un preparat la altul, în funcţie de tehnologie.

Separarea produselor din lichidul rezultat din fermentaţie constituie o problemă dificilă, indiferent de procedeul aplicat. Dificultăţile provin din faptul că produsele biologic active obţinute în general prin biosinteză sunt substanţe termolabile, ceea ce impune evitarea degradării sau modificării chimice a acestora.

Pentru a alege cea mai adecvată metodă de separare a produselor biosintetizate, este necesar să se cunoască proprietăţile fizico-chimice a acestora şi anume:

- *solubilitatea*:
  - în apă sau în soluţii diluate de săruri;
  - în solvenţi polari (metanol, etanol, acetonă);
  - în solvenţi slab-polari (cloroform, hidrocarburi);
- *stabilitatea în soluţie*, în funcţie de *p*H: efectul temperaturii; efectul soluţiilor tampon; efectul solvenţilor organici;
- *stabilitatea în stare solidă*, în funcţie de temperatură precum şi efectul umidităţii asupra produsului;
- *proprietăţile fizice*:
  - dializabilitatea prin membrane;
  - adsorbţia pe suprafeţe solide;
  - migrarea în câmp electric;
  - sedimentarea în ultracentrifuge;

- *proprietăţile chimice*:
  - stabilitatea faţă de diverse enzime;
  - stabilitatea la acţiunea unor agenţi chimici.

Pentru separarea produsului din mediile de biosinteză se aplică, în general, următoarele metode:

- extracţia cu solvenţi organici;
- separarea pe schimbători de ioni;
- cromatografia;
- adsorbţia.

În industria de biosinteze există însă metode de prelucrare integrală a mediului de cultură prin aplicarea diferitelor metode de uscare, produsul rezultat fiind utilizat ca atare. Acest mod de prelucrare a mediilor de biosinteză este mult aplicat în tehnologia aditivilor furajeri (conţinând aminoacizi, enzime, vitamine).

Operaţiile chimice cel mai des utilizate în biotehnologia enzimelor şi aplicate industrial sunt: filtrarea, concentrarea, dezagregarea celulară şi atomizarea.

7.1. FILTRAREA MEDIILOR DE BIOSINTEZĂ

Faţă de filtrarea substanţelor chimice, filtrarea mediilor de biosinteză ridică adesea probleme datorită compoziţiei chimice deosebit de complexe a mediilor şi apariţiei materialului biologic (bacterii, fungi) care complică fenomenul.

Operaţia de filtrare a mediilor de biosinteză este adeseori uşurată prin utilizarea adjuvanţilor de filtrare care formează în cursul operaţiei straturi microporoase micşorând diametrul aparent al porilor şi implicit mărind eficienţa de colectare prin reţinerea unor particule de diametru mai scăzut. Utilizarea lor industrială conduce la mărirea vitezei de filtrare şi reducerea consumurilor de materiale. Ca mod de lucru se utilizează una din următoarele scheme :

- pe materialul filtrant (pânză de filtru, hârtie) se aplică un strat subţire de material adjuvant (prin filtrarea unei suspensii apoase de adjuvant). Prin patul filtrant astfel format se execută operaţia de filtrare;
- adjuvantul se amestecă cu suspensia de filtrat; se execută filtrarea recirculând primele porţiuni de filtrat până la limpezirea sa totală;
- raclarea permanentă a stratului de adjuvant, cu ajutorul unor cuţite speciale, astfel încât stratul de adjuvat de filtrare este menţinut la o valoare optimă, iar viteza de filtrare este menţinută constantă. Această variantă este aplicată în cazul filtrelor rotative.

O variantă a operaţiei de filtrare mult utilizată în biotehnologie este filtrarea sterilizantă.

La prelucrarea suspensiilor se face mai întâi o prefiltrare grosieră, urmata apoi de filtrarea sterilizantă propriu-zisă. Pentru filtrarea sterilizantă se montează în filtru plăcile (din acetat de celuloză, azbest sau polimeri sintetici) cu diametru redus al porilor, executând apoi în mod normal operaţia de filtrare.

7.2. DEZAGREGAREA CELULELOR DE MICROORGANISME

Când substanţele biologic active care interesează şi care s-au format în cursul procesului de biosinteză sunt intracelulare, este necesară distrugerea *membranei* celulare semipermeabile şi a peretelui protector în vederea recuperării componentelor respective. Această operaţie se realizează prin procedee de dezagregare.

După natura agentului de dezagregare utilizat, procedeele de dezagregare ale celulelor microbiene se clasifică în:

- procedee mecanice;
- procedee fizice nemecanice;
- procedee chimice;
- procedee enzimatice.

Procedeele mecanice cuprind dezagregarea celulelor în mori coloidale sau în mori vibratoare, menţinând un anumit raport de recirculare, până la dezagregarea totală a celulelor microbiene; în timpul operaţiilor de dezagregare mecanică are loc o creştere a temperaturii materialului biologic. Evitarea acestui fenomen şi menţinerea sistemului la o temperatură acceptabilă se efectuează prin circulaţia unui agent de răcire prin mantaua aparatului.

Dezagregarea celulelor de microorganisme prin procedee fizice, nemecanice, se poate efectua prin decomprimare rapidă, prin îngheţare lentă (datorită sporirii volumului apei la trecerea în stare solidă) sau prin şoc osmotic. Un procedeu deosebit de eficace este aplicarea de vibraţii ultrasonice suspensiei de celule. Vibraţiile cu frecvenţe de cca 20 000 Hz determină dezintegrarea celulelor microbiene.

Dezagregarea celulelor microbiene prin procedee chimice cuprinde distrugerea componentelor lipoproteice ale membranei celulare prin acţiunea detergenţilor cationici sau anionici sau a solvenţilor organici, determinând trecerea în faza lichidă a unora dintre componentele biologic active.

Dezagregarea celulelor microbiene poate fi efectuată şi prin tratarea acestora cu diferite preparate enzimatice. Astfel, liza celulelor bacteriene poate fi indusă prin atacul enzimatic specific al legăturilor α-1,4 dintre moleculele de N-acetilglucozamină şi acidul N-acetilmuramic.

Dezintegrarea biologică enzimatică este una dintre cele mai vechi metode de obţinere a omogenatelor celulare. Astfel, este bine cunoscută descompunerea autolitică a drojdiei de bere uscată la 30°C, timp de 2–3 zile. Dezintegrarea microorganismelor de *Micrococcus lysodeikticus* poate fi realizată cu suc pancreatic, iar a ţesutului muscular cu enzime proteolitice izolate din *Bacillus subtilis*. Dezintegrarea biologică a *E. coli* poate fi realizată cu bacteriofagi.

7.3. CONCENTRAREA MEDIILOR DE BIOSINTEZĂ A ENZIMELOR

Mediile de biosinteză se concentrează prin operaţii specifice industriei chimice, cu deosebirea că este necesară protejarea lichidelor biologice datorită termolabilităţii acestora. Se utilizează adeseori evaporarea în vacuum, care permite efectuarea operaţiei la temperaturi relativ scăzute (25...50°C).

În ultimul timp se practică cu succes procedeele de concentrare atermică, ultrafiltrarea şi osmoza inversă.

Ultrafiltrarea reprezintă procesul de separare a componentelor unei soluţii datorită diferenţelor de volum molecular cu ajutorul unei membrane. Ultrafiltrarea este un procedeu de separare şi purificare a substanţelor biologic active, având următoarele avantaje:

– permite efectuarea concentrării la temperaturi scăzute, micşorând fenomenele de autodigerare şi pierderile în activitate prin denaturarea termică;
– nu necesită modificări de fază (evaporări, condensări);
– nu utilizează substanţe chimice;
– permite purificarea soluţiilor biologic active prin îndepărtarea unor componente cu volum molecular inferior.

Cercetările privind introducerea proceselor cu membrane urmăresc, în general, stabilirea posibilităţilor de utilizare eficientă a unor tipuri de membrane la concentrarea şi purificarea produselor biologic active, în cadrul elaborării tehnologiilor de obţinere a acestora.

Literatura de specialitate în acest domeniu cuprinde studii ample privind teoria proceselor de ultrafiltrare.

În centrul atenţiei cercetătorilor stau două fenomene ce ţin să limiteze performanţele utilizării membranelor în tehnicile de purificare:

– blocarea membranelor („membrane fouling") prin adsorbţie de solut, în special proteine;
– polarizarea de concentraţie (gel polarizare).

Bazele teoretice ale explicării fenomenului de blocare a membranelor de ultrafiltrare datorită proteinelor au fost puse de Turker şi Hubble. Ei menţionează, în cazul fluxului transmembranar nul, un nivel al proteinelor asociate de membrană corespunzător unei izoterme de saturaţie cu un maxim la 207 $\mu g/cm^3$; în condiţiile fluxului prin membrană, această concentraţie creşte până la o nouă valoare limită, independentă de flux, dar depinzând de circulaţia tangenţială a fluidului supus separării. Rezistenţa stratului de proteină adsorbit creşte cu fluxul, grosimea depăşeşte monostratul şi adsorbţia prezintă un caracter reversibil cu regimul hidrodinamic. Referitor la modelul gel-polarizării, s-au stabilit relaţii între fluxul de permeat şi timp precum şi parametrii ce depind de condiţiile de operare (concentraţia macrosolutului, diferenţa de presiune aplicată, coeficientul de permeabilitate) şi de presiunea osmotică, difuzivitate.

Dintre aplicațiile ultrafiltrării, cele din domeniul biotehnologiei ocupă un loc major, metoda fiind utilizată ades la concentrarea și purificarea enzimelor de origine microbiană.

Firma DDS-Danemarca menționează procese industriale de concentrare și purificare prin ultrafiltrare a enzimelor, aplicate la nivelul anului 1987, în peste 80 de țări.

În procesul de izolare și purificare a enzimelor, una din etape o constituie demineralizarea soluției enzimatice. Această operație are loc în paralel cu concentrarea prin ultrafiltrare întrucât ionii anorganici având volum mic trec prin membrana de ultrafiltrare. Din această cauză, aplicarea metodei de concentrare prin ultrafiltrare a soluțiilor enzimatice conduce la eliminarea operației de dializă, efectuată în mod obișnuit într-un flux de purificare.

7.4. USCAREA PRIN ATOMIZARE A MEDIILOR DE FERMENTAȚIE CU ACTIVITATE ENZIMATICĂ

Uscarea prin pulverizare se folosește pentru materialele care în faza inițială sunt lichide (soluții, suspensii, paste subțiri). Acestea, în vederea uscării, sunt pulverizate în particule de dimensiuni mici. Prin pulverizare la dimensiuni mici se înțelege obținerea unei suspensii de lichid constituită din particule de dimensiuni între 2 și 200 μm.

Datorită dimensiunilor particulelor, operația a fost denumită și atomizare; în uscătoarele cu pulverizare, uscarea are loc foarte repede, astfel încât, materialul nu are timp să se încălzească peste limita admisibilă și temperatura lui este apropiată de temperatura de evaporare a lichidului.

Materialul uscat se obține sub formă de pulbere și nu este necesară o mărunțire ulterioară.

Metoda este aplicată, în general, în condiționarea enzimelor de mare tonaj, utilizate în hrana animalelor ca aditivi furajeri (proteaze, amilaze, celulaze) și se realizează prin atomizarea integrală a mediului de cultură fără o altă purificare.

Partea a II-a

TIPURI DE PROCESE BIOTEHNOLOGICE

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- **BIOPROCESE ANAEROBE**
- **BIOPROCESE AEROBE**
- **ANTIBIOTICE**

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8. BIOPROCESE ANAEROBE

Capacitatea de a creşte în condiţii *anaerobe* este limitată la procariote (bacterii); la eucariote creşterea anaerobă este un proces tranzitoriu (microorganisme facultativ anaerobe).

Energia pentru creşterea anaerobă a bacteriilor poate fi obţinută prin respiraţie anaerobă şi prin fermentaţie.

Microorganismele *facultativ anaerobe* au capacitatea de a creşte aerob utilizând oxigen sau anaerob, utilizând compuşi organici (fermentaţie) ca acceptori finali ai electronilor produşi în cursul catabolismului; au o rată mai mică de degradare a glucidelor în aerobioză decât în anaerobioză.

Fermentaţia este un proces de catabolism care are loc în condiţii de anaerobioză şi în care energia este obţinută prin utilizarea unor compuşi organici, atât ca donori, cât şi ca acceptori de electroni. Microorganismele care produc fermentaţii sunt facultativ sau obligatoriu anaerobe. Microorganismele anaerobe mor în contact cu aerul (O_2). Cele facultativ anaerobe sunt heterotrofe (capabile de respiraţie în prezenţa O_2 şi produc fermentaţii în absenţa acestuia).

Gama substanţelor fermentescibile este foarte largă: poliglucide (celuloză, amidon, chitină), diglucide (zaharoză, lactoză, maltoză), hexoze (glucoză, fructoză, galactoză), pentoze, polialcooli (glicerol, manitol); în cazul bacteriilor: aminoacizi, acizi organici, purine, pirimidine.

Produşii fermentaţiilor sunt, de asemenea, foarte diferiţi:

- alcooli (etanol, propanol, butanol, 2,3-butandiol, glicerol);
- acizi (lactic, formic, acetic, propionic, butiric);
- esteri (etilacetat, etilbutiric, poli β-hidroxibutirat);
- diferite substanţe gazoase (H_2, CH_4, CO_2).

Drojdiile şi lactobacilii homofermentativi sunt implicaţi în fermentaţii pure, producând aproape exclusiv alcool, acid lactic şi numai urme din alţi produşi; alte bacterii metabolizează acidul piruvic mai departe, ducând la formarea unor produşi ca: acid butiric, alcool butilic, acetonă, acid propionic, izopropanol.

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

Exemple de respirații anaerobe (fermentații):

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$
Glucoză — Alcool etilic

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_3H_6O_3$
Glucoză — Acid lactic

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow C_3H_7COOH + 2CO_2 + 2H_2$
Glucoză — Acid butiric

În laborator, condițiile de anaerobioză necesare fermentațiilor se realizează prin însămânțarea în flacoane cu medii lichide, complet umplute, acoperite lax cu un dop.

În industrie, incubarea se face fără agitare, iar O_2 nu poate pătrunde în mediul din fermentator; oxigenul de la suprafața mediului este înlocuit cu dioxidul de carbon produs în timpul fermentației care este mai greu. Multe fermentații anaerobe au o importanță deosebită pentru că furnizează produși cu valoare economică ridicată, ce pot fi obținuți pe scară industrială.

Tabelul 8.1

Bacterii fermentative capabile să se dezvolte în condiții de anaerobioză

Microorganismul producător	Fermentația	Substratul fermentat	Produsul fermentației
Lactobacillus casei	Lactică	Glucoză	Lactat
Leuconostoc mesenteroides	Lactică	Glucoză	Lactat
Bifidobacterium bifidum	Lactică	Glucoză	Acetat
Zymomonas mobilis	Alcoolică	Glucoză	Etanol
Escherichia coli	Acidă mixtă	Glucoză	Etanol, acetat, lactat
Enterobacter aerogenes	Butandiolică	Glucoză	Etanol, 2,3-butandiol
Clostridium aceticum	Homoacetică	Fructoză	Acetat
Clostridium butiricum	Butirică	Glucoză	Butirat
Clostridium acetobutylicum	Butirică	Glucoză	Butirat, butanol

8.1. FERMENTAȚIA ALCOOLICĂ

Fermentația alcoolică are numeroase aplicații practice în industrie la fabricarea: spirtului, băuturilor spirtoase, vinului, berii, sucurilor de fructe, precum și în panificație.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Etanolul se obține chimic, dar și prin fermentarea completă de către unele drojdii a diferitelor glucide, umată de distilarea alcoolică.

Drojdiile au un echipament enzimatic bogat, datorită căruia obțin în mediul anaerob energia necesară manifestărilor lor vitale, prin procesul de fermentație alcoolică a glucidelor, după reacția globală:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ CH_3\text{-}CH_2OH + 2CO_2$$

În realitate, mersul reacției este mult mai complicat, formându-se și numeroși compuși secundari de fermentație.

Începutul fermentației corespunde perioadei de multiplicare a drojdiei, cu un consum al sursei de carbon de 2% și o degajare slabă de CO_2 (fermentație redusă). După 20 de ore, fermentația este însoțită de degajare intensă de dioxid de carbon, iar concentrația în sursă de carbon se reduce de la 85% la 15% din cea inițială (fermentația principală). Urmează o perioadă liniștită, cu degajare slabă de dioxid de carbon și concentrația sursei de carbon reziduală 2% (fermentația secunadară). Formarea etanolului se observă după mai multe zile, în funcție de temperatură.

Prin procesul de fermentare alcoolică rezultă o energie de doar 8,16 kcal, fapt confirmat și de randamentul energetic scăzut realizat într-o unitate de timp. Sunt necesare 12 molecule de glucoză pentru descompunerea în etanol în vederea obținerii aceleiași cantități de energie care ar rezulta prin respirația unei singure molecule de glucoză. Într-un proces mixt de descompunere a glucidelor pe cale anaerobă și aerobă, 98% din această cantitate se folosește pentru fermentare și 2% pentru respirație.

În biotehnologie se realizează fermentații dirijate, cu tulpini selecționate, care durează 20–24 de ore. Scopul acestor fermentații este obținerea de alcool etilic industrial cu randamente mari; se utilizează tulpini de *Sacharomyces cerevisiae* selecționate.

8.2. FERMENTAȚIA LACTICĂ. PROBIOTICE

Bacteriile producătoare de acid lactic au fost utilizate la prepararea și prelucrarea alimentelor, din timpuri istorice. Bacteriile lactice sunt implicate în obținerea alimentelor fermentate din materii prime agricole, cum sunt: laptele, carnea și produsele vegetale, care dețin o pondere importantă în industria alimentară. Tulpinile de bacterii lactice folosite pentru obținerea produselor alimentare sunt izolate și selectate numai după numeroase testări.

În ultimii ani, bacteriile lactice au fost folosite și ca produse de tip probiotic. Probioticele sunt microorganisme care, după o administrare orală, sunt capabile să colonizeze tractul digestiv și să păstreze sau să determine o creștere a

florei naturale digestive, prevenind aderarea microorganismelor patogene la peretele intestinului şi asigurând securitatea utilizării optime a hranei. Unele tulpini de bacterii lactice inhibă proliferarea bacteriilor patogene prin producerea de acizi organici şi prin scăderea *p*H-ului. De asemenea, unele bacterii lactice produc peroxidul de hidrogen şi previn aderarea bacteriilor patogene la peretele intestinului. Datorită acestor proprietăţi, bacteriile lactice pot fi folosite ca probiotice.

Prin enzimele proprii, probioticele măresc utilizarea digestivă a hranei precum şi procesele de detoxifiere. Astfel, probioticele produc cantităţi mari de β-galactozidază, contribuind la ameliorarea digestiei lactozei. Cu ajutorul bacteriilor lactice se reduce nivelul fenolului şi al indolului, substanţe ce se acumulează ca rezultat al dezechilibrării florei intestinale.

Probioticele stimulează activarea sistemului imunologic acţionând ca barieră de protecţie a tubului digestiv. Pot fi folosite în combaterea diferitelor forme de cancer, atât pe calea activării sistemului imunitar, cât şi prin inhibarea unor enzime implicate în carcinogeneza intestinală.

Unele tulpini de bacterii lactice au capacitatea de a cataboliza colesterolul şi, ca urmare, aceste tulpini bacteriene au activitate hipocolesterolemiantă.

Lactobacilii sunt folosiţi pentru prevenirea infecţiilor urogenitale, datorită proprietăţii acestor tulpini bacteriene de a intra în competiţie cu microorganismele patogene în ceea ce priveşte aderenţa la epiteliul urogenital.

Datorită acestor proprietăţi, a utilizării lor cu uşurinţă în laborator, a faptului că cele mai importante proprietăţi metabolice sunt codificate de gene plasmidiale, bacteriile lactice constituie un material propice pentru ameliorare.

8.2.1. Microorganisme care produc fermentaţia lactică

Grupul de bacterii lactice este, în general, puţin definit, fără a se preciza înrudirile. S-a acceptat că toţi membrii grupului de bacterii lactice au drept caracteristică producerea de acid lactic din hexoze. Pe baza produşilor finali ai metabolizării glucozei, bacteriile lactice care produc acid lactic ca unic produs major se numesc homofermentative, iar cele care produc cantităţi egale de acid lactic, etanol, CO_2 se numesc heterofermentative. Numai microorganismele homofermentative prezintă importanţă pentru producţia de acid lactic. *Streptococcus cremoris* şi *Streptococcus lactis* sunt cele mai importante bacterii lactice folosite în industrie. Speciile preferate din punct de vedere comercial pentru producţia de acid lactic aparţin grupului *Lactobacillus*.

Caracteristicile bacteriilor lactice din genurile *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* sunt următoarele: sunt homofermentative; temperatura optimă de creştere ≥ 40°C; *p*H-ul optim este între 5 şi 7; sunt facultativ anaerobe, randamentul

producției de acid lactic din glucoza fiind >90% (g/g); pot produce acid lactic în concentrație >3%; pot produce unul sau ambii izomeri; sunt slab proteolitice sau lipolitice, cu capacități sintetice foarte limitate, necesitând prezența în mediu a vitaminelor din complexul B, aminoacizilor, bazelor purinice și pirimidinice.

În cazul lactobacililor, deși majoritatea sunt aerotoleranți sau microaerofili, în condiții anaerobe se obține o creștere optimă a acestora. Deși *Lactobacilii* nu posedă citocromi, catalază și dismutază, totuși majoritatea au flavin oxidaze și peroxidaze care oxidează NADH, folosind oxigenul ca acceptor final de electroni. Astfel, *Lactobacillus plantarum* produce mai multă biomasă la o viteză scăzută de transfer a oxigenului decât în condiții de strictă anaerobioză. Unii lactobacili necesită prezența manganului drept cofactor în sistemele enzimatice ca, de exemplu, pentru lactatdehidrogenază (LDH), ARN-polimerază și manganocatalază.

Prescott și Dunn au studiat producția de acid lactic la fungi. Soccol și colaboratorii au studiat 19 specii de *Rhizopus*. Numai patru produc L(+) acid lactic la *p*H = 6 în condiții aerobe. Au fost studiați factorii de control pentru producerea de acid lactic în cazul unor tulpini de *Lactobacillus delbrueckii* NCIB 8130, în condiții improprii de creștere. Aceste specii de *Lactobacillus* sunt folosite pentru producerea comercială de acid lactic prin fermentație. Multe microorganisme din grupul bacteriilor lactice folosite în industria alimentară produc metaboliți antimicrobieni, care pot fi folosiți pentru conservarea hranei.

Creșterea rolului comercial al bacteriilor lactice pentru producerea de hrană fermentată a trezit interesul pentru proprietățile biochimice și microbiologice incluzând și proprietățile genetice.

8.2.2. Căile metabolice la bacteriiie lactice

Bacteriile lactice reprezentate prin genurile: *Streptococcus* (*Sc.*), *Enterococcus* (*Ec.*), *Lactococcus* (*Lc.*), *Lactobacillus* (*Lb.*), *Leuconostoc* (*Ln.*), *Pediococcus* (*Pc.*) și *Bifidobacterium* (*Bf.*) folosesc una din următoarele căi fermentative:

- calea homofermentativă (calea Embden-Meyerhof-Parnas (EMP));
- calea heterofermentativă (calea pentozo-fosfocetolazei (PPC));
- calea bifidobacteriilor (calea fructozo 6-fosfocetolazei).

În funcție de natura și concentrația produșilor rezultați în urma fermentației glucozei, bacteriile lactice se împart în două grupe: homofermentative și heterofermentative.

Bacteriile lactice homofermentative. Acestă grupă cuprinde unele specii de streptococi (*Sc. mutans, Sc. termophilus),* enterococi (*Ec. faecalis*), lactococi (*Lc. lactis* ssp. *lactis*), pediococi (*Pc. pentosaceus, Pc. halophilus*) și lactobacilli (*Lc. casei, Lc. plantarum*). Aceste bacterii convertesc aproape toată cantitatea de glucoză în acid lactic (90–95%). În cazul bacteriilor lactice homofermentative,

glucoza este transportată şi fosforilată prin intermediul sistemului PT-PEP specific glucozei (manozei) rezultând glucozo-6-P care prin calea EMP este transformată în acid lactic. Fructozo-1,6-difosfat aldolaza este prezentă la toate speciile homofermentative şi este indispensabilă pentru funcţionarea căii EMP. Fructozo difosfat aldolaza catalizează reacţia prin care fructozo-1,6-difosfat este scindat în două fragmente, fiecare fragment având câte trei atomi de carbon: dihidroxiacetonfosfat (DHAP) şi gliceraldehid 3-fosfat (GA3P). Bacteriile homolactice conţin în mod obişnuit concentraţii mari de fructozo difosfat (15–30 mM) important pentru reglare, servind la activarea enzimelor care catalizează ultimele reacţii ale căii glicolitice, adică piruvat kinaza şi lactat dehidrogenaza.

Gena codificatoare pentru L(+) lactat dehidrogenază a fost clonată pentru mai multe specii de bacterii lactice. A fost clonată pentru *Lb. plantarum* [Taguchi şi Ohta, 1991], *Lb. casei* [Hensel şi colab., 1983; Kim şi colab., 1991], *Lc. lactis* [Danos şi colab., 1992] şi *Sc. mutans* [Duncan şi Hillman, 1991]. După elucidarea secvenţei de aminoacizi s-au putut identifica situsurile de legare ale fructozo difosfat şi substratului. S-a demonstrat că toate secvenţele conţin un triplet de glicină [GXGXXG], care explică plierea βαβ şi domeniul de legare a cofactorului pentru numeroase enzime dependente de NAD^+ [Thompson şi Donkersloot, 1992]. Secvenţele de aminoacizi pentru D(–) lactat dihidrogenaza NAD^+ dependentă, fructozo difosfat independentă provenind de la *Lb. bulgaricus* si *Lb. plantarum* au fost descrise relativ recent de Kockhar şi colab. (1992) şi de Tagudu şi Ohta (1991).

În afară de glucoză, bacteriile lactice homofermentative au capacitatea de a fermenta diferite monozaharide, dizaharide şi ocazional hexitoli. Cu excepţia galactozo-1-P şi fructozo-1-P, toate glucidele şi hexitolii fosforilaţi intră în ciclul glicolitic la nivelul glocozo-6-P sau fructozo-6-P. Câteva glucide, cum ar fi lactoza şi zaharoza, sunt metabolizate ca şi glucoza prin fermentaţie homolactică.

Când lactoza este folosită ca sursă de carbon şi este preluată din mediu de un sistem permeazic ATP-dependent (majoritatea lactobacililor şi *Sc. thermophilus*), este convertită iniţial în glucoză şi galactoză cu ajutorul β-galactozidazei; sau, când lactoza este preluată din mediu prin acţiunea sistemului PEP-PTS (fosfoenol-piruvat-sistem fosfotransferazic), este hidrolizată la glucoză şi galactozo-6-P prin acţiunea fosfo β-galactozidazei.

Alte surse de energie, cum ar fi galactoza, sorbitolul, manitolul etc., pot produce în timpul fermentaţiei lor şi diferite cantitaţi de acetat, formiat, acetona, 2,3-butandiol, pe lângă acidul lactic. Pentru unele tulpini de *Lc. lactis*, o parte din acidul piruvic format prin glicoliză poate fi eliminat prin sistem NADPH-dependent, care este activat de L-ornitină sau L-lizină.

Prin calea EMP sunt produşi 2 moli de ATP şi 2 moli de acid lactic, pornind de la 1 mol de glucoză metabolizată (fig. 8.1, *a*).

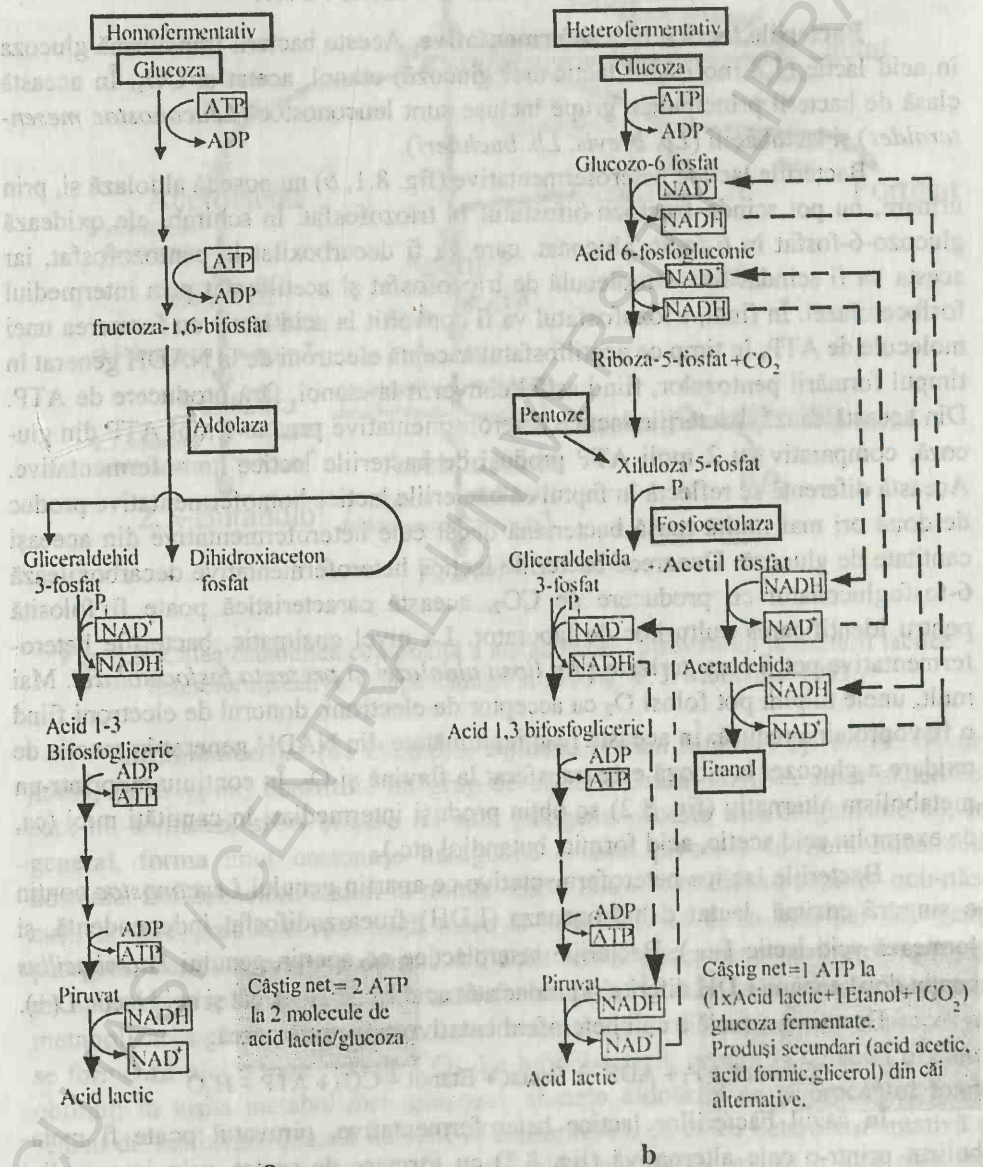


Fig. 8.1. Fermentaţia glucozei de către:
a – bacteriile lactice homofermentative; *b* – bacteriile lactice heterofermentative.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Observație: nu se formează ATP la speciile care conduc la formarea etanolului.

Ecuația generală a căii homofermentative este următoarea:

$$\text{Glucoză} + 2\ P + 2\ ADP \rightarrow 2\ \text{Lactat} + 2\ ATP$$

Bacteriile lactice heterofermentative. Aceste bacterii transformă glucoza în acid lactic (1,8 moli acid lactic/mol glucoză) etanol, acetat și CO_2. În această clasă de bacterii principalele grupe incluse sunt leuconostoc (*Leuconostoc mesenteroides*) și lactobacili (*Lb. brevis*, *Lb. buchneri*).

Bacteriile lactice heterofermentative (fig. 8.1, *b*) nu posedă aldolază și, prin urmare, nu pot scinda fructozo-bifosfatul în triozofosfat. În schimb, ele oxidează glucozo-6-fosfat în 6-fosfo gluconat, care va fi decarboxilat la pentozofosfat, iar acesta va fi scindat într-o moleculă de triozofosfat și acetilfosfat prin intermediul fosfocetolazei. În final, triozofosfatul va fi convertit la acid lactic cu formarea unei molecule de ATP, în timp ce acetilfosfatul acceptă electroni de la NADH generat în timpul formării pentozelor, fiind astfel convertit la etanol, fără producere de ATP. Din această cauză, bacteriile lactice heterofermentative produc 1 mol ATP din glucoză, comparativ cu 2 moli ATP produși de bacteriile lactice homofermentative. Această diferență se reflectă în faptul că bacteriile lactice homofermentative produc de două ori mai multă masă bacteriană decât cele heterofermentative din aceeași cantitate de glucoză. Deoarece bacteriile lactice heterofermentative decarboxilează 6-fosfogluconatul cu producere de CO_2, această caracteristică poate fi folosită pentru identificarea culturilor de laborator. La nivel enzimatic, bacteriile heterofermentative pot fi caracterizate prin *lipsa aldolazei* și *prezența fosfocetolazei*. Mai mult, unele tulpini pot folosi O_2 ca acceptor de electroni, donorul de electroni fiind o flavoproteină redusă. În această reacție, jumătate din NADH generat în reacția de oxidare a glucozei la riboză este transferat la flavină și O_2. În continuare, printr-un metabolism alternativ (fig. 8.2) se obțin produși intermediari în cantități mici (ca, de exemplu: acid acetic, acid formic, butandiol etc.).

Bacteriile lactice heterofermentative ce aparțin genului *Leuconostoc* conțin o singură enzimă, lactat dehidrogenaza (LDH) fructozodifosfat independentă, și formează acid lactic D(–). Bacteriile heterolactice ce aparțin genului *Lactobacillus* conțin două enzime LDH diferite și produc atât acid lactic D(–), cât și acid lactic L(+).

Ecuația generală a căii heterofermentative este următoarea:

$$\text{Glucoză} + P_i + ADP \rightarrow \text{Lactat} + \text{Etanol} + CO_2 + ATP + H_2O$$

În cazul bacteriilor lactice heterofermentative, piruvatul poate fi metabolizat printr-o cale alternativă (fig. 8.2) cu formare de acetat, prin intermediul piruvat format liazei. Dacă acetil-CoA este redusă la acetaldehidă se formează etanol concomitent cu regenerarea NAD^+. Piruvat format liaza este extrem de sensibilă la oxigen și este inhibată atât de gliceraldehid 3-fosfat, cât și de dihidroxiaceton fosfat.

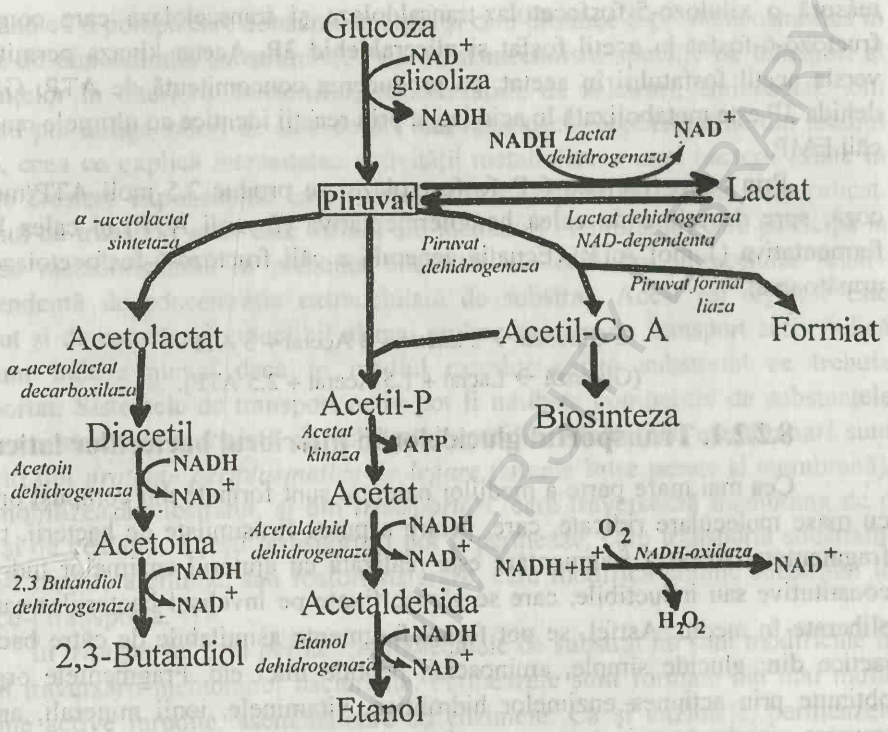


Fig. 8.2. Calea catabolică compozită a metabolizării piruvatului la bacterii lactice heterofermentative. (După Ching Ping Tseng, T. J. Montville, 1993.)

Bifidobacteriile (de exemplu, *Bifidobacterium bifidum*, *Bf. breve*, *Bf. infantis*, *Bf. longum*) constituie un grup de bacterii Gram-pozitive, strict anaerobe, care nu formează spori şi care nu sunt patogene. Aceste microorganisme au, în general, forma unor bastonaşe neregulate şi sunt prezente în flora intestinală normală. Bifidobacteriile sunt în număr foarte mare în intestinul copiilor nou-născuţi, la care produc o rezistenţă mare la infecţii şi se opun apariţiei de agenţi patogeni. Pentru o creştere optimă, bifidobacteriile necesită un mediu complex şi un aport de glucide care să favorizeze fermentaţia. În cazul bifidobacteriilor, prin metabolizarea glucozei se produc 1 mol lactat şi 1,5 moli acetat. În acest proces nu se formează nici o moleculă de CO_2. La bifidobacterii, proporţia de acizi organici obţinuţi în urma metabolizării glucozei, absenţa aldolazei ca şi procentul foarte scăzut de fosfofructokinază nu sunt în conformitate cu calea heterofermentativă şi nici cu cea homofermentativă. În cazul bifidobacteriilor există o altă cale fermentativă a glucidelor. Enzima cheie a acestei căi fermentative este fructozo-6-fosfat fosfocetolaza care, în prezenţa P_i, catalizează reacţia prin care, pornind de la fructozo-6-P, se obţin două fragmente, unul cu 4 atomi de carbon: D-eritrulozo-4-fosfat şi unul cu doi atomi de carbon: acetil fosfat. Bifidobacteriile posedă în egală

măsură o xilulozo-5-fosfocetolaz-transaldolaza şi transcetolaza care convertesc fructozo-6-fosfat în acetil fosfat şi gliceraldehid 3P. Acetat kinaza permite conversia acetil fosfatului în acetat, cu producerea concomitentă de ATP. Gliceraldehida 3P este metabolizată în acid lactic prin reacţii identice cu ultimele reacţii ale căii EMP.

Prin calea fructozo 6-P–fosfocetolazei se produc 2,5 moli ATP/mol glucoză, spre deosebire de calea homofermentativa (2 moli ATP) şi calea heterofermentativa (1 mol ATP). Ecuaţia generală a căii fructozo-6-fosfocetolazei este următoarea:

2 Glucoză → 2 Lactat + 3 Acetat + 5 ATP

(Glucoză → Lactat + 1,5 Acetat + 2,5 ATP).

8.2.2.1. Transportul glucidelor în interiorul bacteriilor latice

Cea mai mare parte a mediilor naturale sunt formate din compuşi organici cu mase moleculare ridicate, care, pentru a putea fi asimilate de bacterii, trebuie fragmentate. Această fragmentare este realizată cu ajutorul enzimelor hidrolitice constitutive sau inductibile, care se găsesc fixate pe învelişul bacteriilor sau sunt eliberate în mediu. Astfel, se pot forma fragmente asimilabile de către bacteriile lactice din: glucide simple, aminoacizi, peptide mici etc. Fragmentele organice obţinute prin acţiunea enzimelor hidrolitice, vitaminele, ionii minerali, apa pot traversa membrana prin transport activ sau pasiv şi pot ajunge în interiorul bacteriilor lactice. Unele substraturi nu comportă decât un singur sistem de transport, în timp ce altele pătrund în bacterii prin diferite căi.

Transportul pasiv. Este independent de metabolism, fiind rezultatul unui gradient de concentraţie a fiecărei substanţe şi nu implică nici un consum energetic. Transportul pasiv cuprinde difuzia liberă şi difuzia facilitată. *Difuzia liberă* este mecanismul prin care membrana citoplasmatică este traversată datorită mişcărilor moleculelor unui substat (substrat sau factor de creştere), membrana comportându-se ca o membrană osmotică inertă. Fluxul moleculelor depinde de concentraţia lor în mediu: moleculele se deplasează din mediu cu concentraţie mai mare spre mediu cu concentraţie mai mică, până se ajunge la starea de echilibru, deplasarea moleculelor realizându-se în funcţie de mediu şi de temperatură. Prin difuzie liberă ajung în bacterie substanţe liposolubile, substanţe gazoase şi molecule neutre având dimensiuni mici.

În cazul *difuziei facilitate*, transportul moleculelor din mediul extern se realizează prin intermediul unui mediator mobil, care efectuează naveta între cele două feţe ale membranei. Prin acest mod de difuzie, concentraţia intracelulară a substanţei transportate nu depăşeşte concentraţia extracelulară.

Transportul activ. Este strict dependent de metabolismul celular şi poate continua atâta timp cât celula este capabilă să mobilizeze rezervele metabolice. Acest transport se face împotriva unui gradient de concentraţie şi, ca urmare, se

aseamănă cu o pompă care consumă energie şi care produce o presiune osmotică în funcţie de concentraţia substratului. Prin acest mecanism specific de transport al substanţelor în interiorul bacteriilor, concentraţiile de zaharuri, aminoacizi, ioni minerali pot atinge valori de sute de ori mai mari decât concentraţiile din mediul extern, ceea ce explică intensitatea activităţii metabolice a unei bacterii aflate în faza de creştere exponenţială care-i permite să se reproducă într-un ritm ridicat. Sistemul de transport activ este format din mediatori membranari care participă la reglarea metabolismului în prezenţa unei stări de echilibru intracelular relativ independentă de concentraţia extracelulară de substrat. Acest rol reglator este susţinut şi de caracterul inductibil al mai multor sisteme de transport activ, adică ele sunt induse numai dacă în mediul exterior există substratul ce trebuie transportat. Sistemele de transport activ pot fi inhibate competitiv de substanţele care au o structură apropiată de substratul specific. Mediatorii membranari sunt alcătuiţi din *proteine periplasmatice de legare* (situate între perete şi membrană), care mobilizează substratul, şi din *transportori*, care traversează membrana de o parte şi de cealaltă. Aceşti transportori pot fi permeaze, care transportă substratul fără a-l modifica chimic, sau fosfotransferaze, care modifică chimic substratul în timp ce-l transportă.

În *transportul prin permeaze*, moleculele de substrat nu sunt modificate în timpul traversării membranei bacteriene. Permeazele sunt formate din mai multe proteine active înrudite, asemănătoare cu enzimele. Ca şi enzimele, permeazele sunt stereospecifice, inductibile şi se supun inhibiţiei competitive. Forţa electronmotrice de pompare este produsă, pe de o parte, prin energia chimică degajată prin hidroliza ATP în ADP şi P_i (sub acţiunea unei ATP-aze care are o afinitate crescută pentru substratul specific de transportat) şi, pe de altă parte, prin combinarea unui potenţial electric membranar şi a unui gradient chimic de protoni la traversarea membranei. Numeroase permeaze care intervin în transportul activ al glucidelor, aminoacizilor, peptidelor, citratului etc. au fost evidenţiate la bacteriile lactice.

În cazul *transportului prin fosfotransferaze*, moleculele de substrat suferă o modificare chimică şi se acumulează sub această formă transformată în citoplasmă. În acest sistem, transportul substanţelor este catalizat de un grup de enzime care utilizează fosfoenol piruvatul ca o sursă de energie. Acest sistem intervine în transportul glucidelor, care necesită trei reacţii în cazul transportului activ (de exemplu, transportul lactozei la bacteriile lactice) (fig 8.3):

$$\text{PEP} + \text{HPr} \xrightarrow[Mg^{2+}]{\text{E I}} \text{Piruvat} + \text{P-HPr}$$

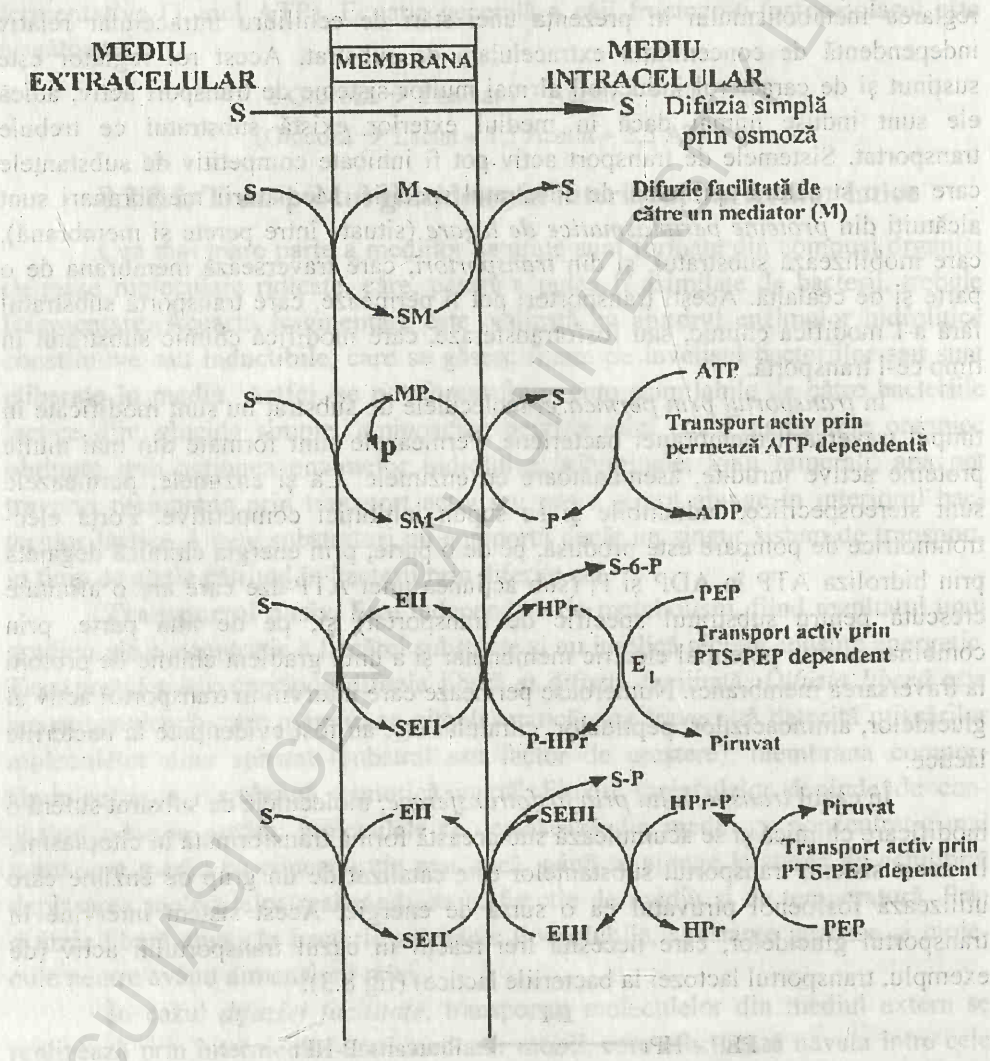
În această reacţie, fosfoenol piruvatul (PEP) prezent în citoplasmă donează fosfatul unei proteine membranare (HPr) lipsită de specificitate pentru lactoză, proteină care este fosforilată în fosfo-HPr (P-HPr). Reacţia este catalizată de o enzimă citoplasmatică (E I) nespecifică pentru lactoză.

$$2P - HPr + E\,III^{lac} \longrightarrow 2\,HPr + E\,III^{lac}\text{-}2P$$

unde E III^{lac} este o enzimă citoplasmatică, solubilă şi specifică pentru lactoză.

$$E\,III^{lac}\text{-}2P + 2\,Lactoză \xrightarrow[Mg^{2+}]{E\,II^{lac}} E\,III^{lac} + 2\,Lactoză\text{-}P$$

unde E II^{lac} este o enzimă membranară şi specifică pentru lactoză.



S: substrat asimilabil
M: mediator în transport
ATP: adenozin trifosfat
PEP: fosfoenolpiruvat

HPr: proteine membranare nespecifice pentru substrat
EI: enzime citoplasmatice nespecifice pentru substrat
EII: enzime membranare specifice pentru substrat
EIII: enzime citoplasmatice specifice pentru substrat

Fig. 8.3. Principalele sisteme de transport ale substraturilor prin membrana celulară.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Enzimele E II^{lac} şi E III^{lac} sunt inductibile în prezenţa lactozei şi galactozei.

Fiecare moleculă de lactoză fosforilată este degradată în citoplasmă prin diferite căi în conformitate cu caracteristicile speciei bacteriene şi condiţiile de mediu. Existenţa sistemului fosfotransferazei PEP dependente (PTP-PEP dependent) a fost demonstrată în cazul transportului activ al zaharurilor. S-a demonstratrat că enzimele E I şi proteina HPr există la toate sistemele fosfotransferazei.

8.2.2.2. Bioenergetica la bacteriile lactice

În general, energia metabolică a lactobacteriilor este furnizată prin fosforilarea unui substrat (glucide) şi prin fluxul de produşi finali eliminaţi prin cotransport cu protoni. În timpul creşterii în prezenţa glucidelor asimilabile, bacteriile lactice menţin o forţă protonmotrice (*fpm*) ridicată şi un potenţial al fosfatului bogat în energie (ATP şi PEP). Când furnizarea de energii încetează, intermediarii energetici se consumă rapid, apoi, la începutul privării de nutrienţi, fondul intern de PEP creşte rapid. Acest lucru favorizează capacitatea microorganismului de a acumula într-o anumită perioadă de timp o sursă de energie, utilizând un sistem PEP dependent. La bacteriile lactice, în generarea de energie metabolică intervin două procese esenţiale: pe de o parte procesul legat de fosforilarea substratului şi, pe de altă parte, procesul ce rezultă din fenomenele chimio-osmotice generatoare de forţă protonmotrice. În procesul legat de fosforilarea substratului, energia – eliberată prin reacţiile de dehidrogenare (oxidare) sau prin acţiunea liazelor – este folosită pentru sinteza de ATP. În degradarea zaharurilor, procesul de fosforilare intervine la două niveluri. În condiţii de anaerobioză, lactobacteriile produc doi moli de lactat pentru un mol de hexoză. În condiţii de aerobioză, un rol important îl are NADH oxidaza, care catalizează reacţii prin care oxigenul molecular acceptă protoni. Oxigenul molecular poate accepta şi protoni proveniţi de la piruvat, dar în acest caz reacţia este catalizată de altă enzimă, şi anume piruvat oxidaza, rezultând CO_2, H_2O şi acetilfosfat. Prin conversia acetilfostatului în acetat rezultă surplus de molecule de ATP (fig. 8.4).

Al doilea mecanism generator de energie este reprezentat de pompele de protoni care transportă ionii de hidrogen din citoplasmă către mediul extern. Conform teoriei chimio-osmotice a lui Mitchell, acest transport rezultă din generarea în membrană a unui potenţial electric $\Delta\psi$ (de sarcină negativă în interiorul celulei) şi un gradient chimic de protoni ($-z\Delta pH$) de-a lungul membranei (pH alcalin în interiorul celulei). Suma acestor două forţe este forţa proton-motrice ($fpm = \Delta p = = \Delta\psi - z\Delta pH$). Această forţă proton-motrice activează ATP-aza membranară (stimulată şi de ioni de Ca^{2+} şi Mg^{2+}). ATP-aza membranară funcţionează reversibil. Energia gradientului electrochimic este convertită în

energie chimică sub forma sintezei de ATP sau gradienților ionici. Crearea și menținerea unei forțe proton-motrice prin hidroliza ATP a condus la consum mare de ATP și, ca urmare, bacteriile lactice, pentru a limita pierderea de energie, au dezvoltat o reglare a fluxului de ioni lactat într-un sistem simport cu doi protoni. Deoarece efluxul de lactat este continuu, o forță proton-motrice e produsă continuu.

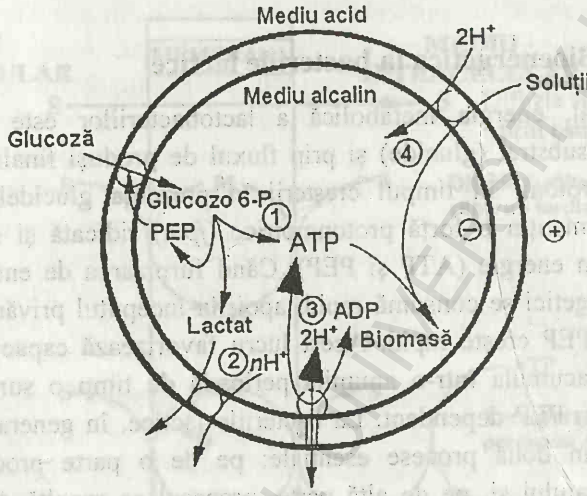


Fig. 8.4. Schemele proceselor generatoare și consumatoare de energie în timpul metabolismului la lactobacterii:

1 – sinteza de ATP prin glicoliză; *2* – cuplarea efluxului de protoni cu efluxul de ioni lactat; *3* – cuplarea efluxului de protoni cu consumul de ATP sau a influxului de protoni cu producerea de ATP; *4* – cuplarea influxului de protoni cu influxul de soluție.

S-au efectuat experiențe în care s-au analizat consecințele modificărilor mediului asupra contribuției efluxului de lactat, la energia metabolică. Astfel de experiențe au fost realizate pe *Lc. lactis* ssp. *cremoris* în culturi discontinue și s-au studiat: forța proton-motrice și gradientul de lactat în timpul creșterii bacteriilor. Raportul gradient de concentrație lactat/forță proton-motrice se micșorează în timpul creșterii bacteriei și, ca urmare, scade contribuția efluxului de lactat la energia metabolică. S-a constatat că *p*H-ul se micșorează brusc la sfârșitul fazei de creștere exponențială, dar organismul în creștere menține *p*H-ul său intern la o valoare constantă de 6,6, care determină formarea unui gradient de *p*H. Scăderea *p*H-ului determină dispariția gradientului de *p*H, diminuarea activității enzimelor până la dispariție, ceea ce produce o scădere a potențialului electric și a forței proton-motrice o dată cu încetarea metabolismului.

Al doilea mecanism de producere a forței proton-motrice la lactobacterii este excluderea de protoni provocată de transferul H^+/lactat. În acest caz, forța motrice este produsă prin efluxul de acid lactic (care este produsul final al

fermentației). Microorganismele pot utiliza o parte din energia metabolică produsă prin glicoliză, energie care s-ar pierde.

8.2.2.3. Comportamentul bacteriilor lactice în prezența oxigenului

Bacteriile lactice pot fi facultativ anaerobe, microaerofile sau relativ aerotolerante. În realitate, nici unul dintre aceste calificative nu se potrivește perfect, deoarece, în funcție de substrat și de condițiile de cultură, o tulpină particulară a grupului de bacterii lactice poate fi anaerob facultativă, microaerofilă sau aerotolerantă.

Producerea energiei în aerobioză. Producerea energiei în cursul unui metabolism aerob este mult mai mare decât în cursul unui metabolism anaerob. De exemplu, metabolismul glucozei se produce astfel:

– în aerobioză:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \longrightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O + 675\ kcal$$

– în anaerobioză:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\,C_2H_5OH + 30\ kcal$$
(Etanol)

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\,C_2H_6O_3 + 25\ kcal$$
(Acid lactic)

Cantitatea de energie necesară pentru a asigura nevoile vitale ale unei bacterii fiind constantă, oricare ar fi condițiie de aerare din mediu, se poate trage concluzia că în aerobioză o bacterie consumă o cantitate de glucide mai mică decât în anaerobioză. O creștere a randamentului de biomasă în aerobioză a fost observată, în special, atunci când concentrația de zaharuri este mică și în cazul speciilor *Ec. faecalis* și *Lb. plantarum*.

Producerea de peroxid de hidrogen. Anumite bacterii lactice consumă oxigenul solubil din mediul de cultură, în măsura în care acesta conține un substrat oxidabil. Reacția de oxidoreducere, care duce la producerea peroxidului de hidrogen, recurge la transferul a doi electroni către o moleculă de oxigen, astfel:

$$O_2 + 2\,e^- + 2\,H^+ \rightarrow H_2O_2$$

Enzimele implicate în reacție sunt următoarele:

– ***piridin-nucleotid oxidaza-redusă.*** Toate bacteriile lactice par să aibă proprietatea comună de a avea: NADH-oxidaza. Există trei tipuri de NADH-oxidază: primele două sunt flavoproteine non-hemice, din care una catalizează reducerea oxigenului în H_2O_2, și cealaltă catalizează reducerea oxigenului în apă. Enzima NADH: H_2O_2 oxidaza a fost pentru prima dată descrisă la *Ec. faecalis* și de atunci prezența sa a fost confirmată la numeroase bacterii lactice. Enzima de origine citoplasmatică este instabilă și nu a fost purificată:

$$NADH + H^+ + O_2 \xrightarrow{\text{NADH: } H_2O_2 \text{ oxidaza}} NAD^+ + H_2O_2$$

$$2\ NADH + 2\ H^+ + O_2 \xrightarrow{\text{NADH: } H_2O_2 \text{ oxidaza}} 2\ NAD^+ + 2\ H_2O_2$$

– ***piruvat oxidaza***, care catalizează reacţia directă a piruvatului cu oxigenul molecular şi a fost descoperită pentru prima dată la *Lb. delbrueckii* precum şi la alte câteva specii de lactobacili:

$$Piruvat + Fosfat + O_2 \xrightarrow[TPP,\ FAD]{\text{Piruvat oxidaza}} Acetilfosfat + CO_2 + H_2O_2$$

– ***α-glicerofosfat oxidaza***. Reacţia catalizată de α-glicerofosfat oxidază se întâlneşte la bacteriile lactice care utilizează glicerolul ca substrat dependent de oxigen pentru creşterea lor. Ea se întâlneşte şi la speciile din genurile *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*. Enzima care a fost parţial purificată este de natură citoptasmatică şi conţine FAD. Aceste oxidaze diferite sunt, în principal, responsabile de producerea H_2O_2 la bacteriile lactice:

$$\alpha\text{-Glicerofosfat} + O_2 \xrightarrow{\alpha\text{-Glicerofosfat oxidaza}} \text{Dihidroxiaceton P} + H_2O_2$$

– ***superoxid dismutaza***. Se pare că dismutarea oxigenului este şi o importantă sursă fiziologică de H_2O_2:

$$2\ O_2 + 2\ H^+ \xrightarrow{\text{Superoxid dismutaza}} H_2O_2 + O_2$$

Acumularea de H_2O_2 de către bacteriile lactice în culturi aerobe se explică prin capacitatea lor mai mare de a forma, decât de a elimina peroxidul;

– ***NADH peroxidaza***: peroxidază flavinică care este foarte răspândită la bacteriile lactice şi este enzima principală responsabilă de descompunerea H_2O_2.

Aerotoleranţa. S-a constatat că majoritatea bacteriilor lactice sunt relativ aerotolerante. Sunt practic singurele bacterii Gram-pozitive aerotolerante care nu au un sistem respirator, care nu posedă citocromi şi nici catalază. Evidenţierea catalazei constituie o etapă importantă în identificarea celorlalte bacterii. Testul cu H_2O_2 pentru evidenţierea catalazelor poate da rezultate irelevante, pentru că anumite bacterii lactice posedă pseudocatalaze non-hemice, care provoacă o reacţie pozitivă. În acest caz, este de preferat să se verifice absenţa citocromului III prin testul cu benzidină, test care va fi negativ pentru toate bacteriile lactice. Trebuie remarcat că citocromii pot fi produşi şi de *Lc. lactis*, *Ln. mesenterioides*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Pc. pentosacens*, atunci când în mediul lor de cultură se adaugă un derivat hemic precursor al citocromilor. Astfel, atunci când o cultură aerată de bacterii lactice acumulează apă oxigenată, este posibil să se evite stoparea creşterii şi distrugerea culturii prin adăugarea catalazei sau a unui derivat hemic, precursor al catalazei.

Totuşi, majoritatea bacteriilor lactice au mijloace proprii de apărare împotriva toxicităţii oxigenului, astfel:

– unii lactococi, enterococi, enterobacili produc fie o peroxidază flavinică utilizând enterococi NADH, ca reductor, după reacţia:

$$NADH + H^+ + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Peroxidază}} NAD^+ + 2\,H_2O$$

fie sintetizează o mangan-superoxid dismutază care catalizează eliminarea radicalilor liberi de oxigen după reacţia:

$$HO^- + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{Superoxid dismutaza}} H_2O_2 + O_2$$

Această enzimă reduce astfel toxicitatea oxigenului. O întâlnim la lactococi şi enterococi;

– *Lb. plantarum* facilitează acţiunea unei pseudocatalaze non-hemice, ce poate fi o mangan-catalază;

– aceeaşi tulpină acumulează ioni de Mn^{2+} care, oxidându-se, duc la dispariţia radicalilor liberi de oxigen.

Mecanismul care permite lui *Ec. faecalis* să se dezvolte fie în aerobioză, fie în anaerobioză, nu a fost bine definit, dar el arată, contrar teoriei, că fosforilarea oxidativă poate avea loc în absenţa citocromului. S-a arătat că anumiţi lactobacili nu pot să se dezvolte decât în aerobioză, atunci când sunt cultivaţi în mediu cu glucoză. În acest caz, intervine un sistem respirator flavinic pe bază de NADH-oxidază şi nu o NADH-peroxidază.

8.2.2.4. Consecinţele comportamentului bacteriilor lactice în aerobioză

Principala consecinţă constă în alterarea metabolismului glucidic, care poate fi benefică. Într-adevăr, în prezenţa oxigenului, NADH-oxidazele şi NADH-peroxidazele generează prin intermediul mecanismelor alternative un surplus de NAD^+. Aceste mecanisme pot duce la economisirea piruvatului, acetil CoA şi acetaldehidei. La genul *Leuconostoc*, produsele finale ale fermentaţiei anaerobe ale glucozei sunt, în principal: lactatul, etanolul şi CO_2; dar în cazul creşterii în aerobioză, acetatul înlocuieşte în proporţie mare etanolul. Într-adevăr, atunci când oxigenul este disponibil, activităţile NADH-oxidazei şi acetat kinazei sunt ridicate, în timp ce cele ale fosfat acetil transferazei şi alcool dehidrogenazei sunt scăzute, ceea ce facilitează sinteza acetatului şi conservarea fosfatului cu potenţial energetic mare. Trecerea de la sinteza etanolului la cea a acetatului dublează cantitatea de ATP produsă din glucoză. Acumularea biomasei tulpinii de *Lc. mesenteroides*, cultivată pe glucoză în aerobioză (NADH-oxidaza pozitivă), este aproximativ dublă faţă de cea obţinută în anaeroabioză. De altfel, vitezele de

creştere pe glucoză în prezenţa oxigenului sunt mai mari decât în absenţa oxigenului, ceea ce arată că viteza de formare a ATP din glucide este o etapă de limitare a creşterii la aceste bacterii.

În metabolismul aerob, celulele au tendinţa de a transforma acetil CoA mai mult în acetat (prin intermediul acetatfosfatului) decât în etanol (prin intermediul acetaldehidei).

Enzimele de tip dehidrogenază care intervin în metabolismul etanolului au nevoie de $NADH_2$ şi, ca urmare, intră în competiţie cu NADH oxidaza/peroxidaza, în timp ce acetil CoA transformată în acetat ajută la sinteza de ATP. Pe de altă parte, sinteza produşilor finali cu patru atomi de carbon (2, 3 butandiol şi diacetil) este accelerată prin disponibilizarea de oxigen, oferind avantaje bacteriilor heterofermentative. Degradarea glucidelor dublează cantitatea de ATP formată prin fosforilare, comparativ cu cea obţinută prin degradarea glucidelor la lactat.

Bacteriile heterolactice sunt aprovizionate cu acetat printr-un mecanism de sinteză, neafectat de prezenţa oxigenului. În consecinţă, bacteriile heterolactice pot profita de pe urma acestei cantităţi mari de ATP, atât prin creşterea de biomasă, cât şi prin accelerarea creşterii. Efectele sunt remarcabile în special la concentraţii mici de glucide. Creşterea aerobă permite anumitor bacterii lactice să metabolizeze substraturi cum sunt: glicerolul, manitolul, sorbitolul şi lactatul care nu poate fi utilizat în absenţa oxigenului.

8.2.2.5. Sistemul proteolitic al bacteriilor lactice

Principala funcţie a bacteriilor lactice este rapida conversie a glucidelor în lactat, rezultând scăderea *p*H-ului necesar pentru o producţie bună din punct de vedere calitativ. Sistemul proteolitic al bacteriilor lactice este important pentru creşterea acestor bacterii pe substraturi bogate în proteine. Cum bacteriile lactice sunt pretenţioase din punct de vedere nutriţional, ele necesită suplimentarea exogenă cu diferiţi aminoacizi, nucleotide, vitamine. În laptele natural, concentraţiile aminoacizilor liberi şi ale peptidelor cu greutate moleculară mică sunt suficiente doar pentru a creşte densitatea celulară, ce corespunde la 8–10 % din maximul găsit în laptele coagulat, fiind astfel sub minimum necesar pentru o producţie rapidă de acid. Deoarece densitatea celulară creşte, proteinele din lapte devin cea mai importantă sursă de azot şi un set funcţional de proteinaze şi peptidaze este necesar pentru aprovizionarea celulelor cu aminoacizi şi peptide mici.

În ultimii ani se observă o intensificare a cercetărilor referitoare la utilizarea bacteriilor lactice pentru fermentarea unei game largi de produse alimentare (lapte, brânzeturi, carne) şi produse furajere, precum şi a complexului proteolitic.

Preluarea aminoacizilor şi a peptidelor este următorul pas important în utilizarea proteinelor şi peptidelor din lapte de către bacteriile lactice, procesul fiind mediat de sisteme de transport distincte. Un efect important al acţiunii

sistemului proteolitic este generarea de aminoacizi şi peptide care dau produşilor de fermentaţie proprietăţile lor caracteristice. Proteinazele bacteriilor lactice îndeplinesc primul pas în cascada reacţiilor care conduc la degradarea cazeinei.

Studiile biochimice ale proteinazelor arată că aceste enzime sunt proteine cu greutate moleculară mare, variind de la 80 la 145 kDa, având un *p*H optim între 5,5 şi 6,5, un punct izoelectric 4,4 – 4,55 şi fiind stabilizate sau activate uneori de ioni de calciu. Enzimele sunt blocate de fenilmetilsulfonilfluorură (PMSF) sau de diizopropilfluorofosfat (DIFP), fiind deci proteinaze tip serină. Este în general admis că proteinazele sunt localizate, în principal, în peretele celular. Întrucât se recomandă asocierea unui număr variabil de lactococi în fermentarea produselor lactate, activităţile proteolitice diferă în funcţie de tulpini.

8.2.3. Fermentaţia lactică, echipamente şi tehnologie

Prin fermentaţie lactică se înţelege procesul biologic în care rezultă ca produs principal acidul lactic.

Fermentaţia lactică are numeroase aplicaţii practice:

– producţia de acid lactic – în industria alimentară (conservarea cărnii, peştelui, legumelor; la prepararea şerbetului şi dulceţurilor; acidifiant al sucurilor, siropurilor etc.);
– în medicină (antiseptic);
– în industria chimică (mordant la colorarea şi imprimarea textilelor);
– în industria pielăriei;
– la prepararea laptelui acru, a iaurtului şi a altor produse lactate;
– la conservarea şi însilozarea nutreţului necesar hranei bovinelor;
– la obţinerea unor băuturi din cereale, a unor specii de bere etc..

Mediile de cultură (conţinând glucide) din fermentatoare cu temperatura de 45...50°C este însămânţată cu o cultură selecţionată de *Lactobacillus delbrueckii* (pentru amidon, glucoză, melase), *Lactobacillus bulgaricus* (pentru zer), *Lactobacillus plantarum* (pentru leşii bisulfitice). După 8 – 10 zile, 90 – 98% din glucidele fermentate sunt transformate în acid lactic. Pe măsură ce se formează acid lactic, el este neutralizat cu $Ca(OH)_2$, astfel încât produsul final format este lactatul de calciu. Acidul lactic este separat din lactat prin adăugarea de H_2SO_4, care precipită calciul sub formă de $CaSO_4$. Soluţia de acid lactic este concentrată la 50 – 80% acid lactic prin evaporare în vid, după care se purifică.

Pentru producerea de acid lactic prin fermentaţie se pot utiliza, în general, tehnologii standard de fermentaţie. Deşi procesele discontinue au fost utilizate în mod curent, studiile au condus la procese continue de fermentaţie. Tyagi şi colab. (1991) au analizat câteva sisteme de fermentaţie discontinue şi continue pentru producerea acidului lactic şi au prezentat comparaţii între diferite tipuri de

bioreactoare. Câteva caracteristici ale procesului de fermentare pentru producerea acidului lactic sunt prezentate în tabelele 8.2 şi 8.3.

Tabelul 8.2

Caracteristicile procesului de fermentaţie pentru producerea acidului lactic

Caracteristici	Valori şi cantităţi	Bibliografie
Temperatura, °C	43 ≈ 49 ≈ 30, 45...50 30...50	Burton (1937) Inskeep şi colab.(1956) Prescott & Dunn (1959) Snell & Lowery (1964)
*p*H-ul	6–7 5,8–6 < 6	Burton (1937) Inskeep şi colab. (1956) Snell & Lowery (1964)
Agent de neutralizare	NH_3, K_2CO_3,Na_2CO_3 $Ca(OH)_2$, $CaCO_3$ $Zn(OH)_2$, $Zn\ CO_3$	Kempe şi colab.(1950) Prescott & Dunn (1959) Lockwood (1979) Prescott & Dunn (1959)
Concentraţia iniţială în glucide, % Concentraţia finală de produşi, % Randamentul, %	5–20 < 12–15 85–90 90–95	Prescott & Dunn (1959) Peckham (1944) Prescott & Dunn (1959) Vick Roy (1985)
Concentraţia de glucide reziduale, % Concentraţia de inocul, % Timpul de fermentaţie, zile Productivitatea reactorului, kg $m^{-3}h^{-1}$ Materialul de construcţie al bioreactorului	<0,1 5–10 1–6 1–3 Lemn Oţel inoxidabil	Daly şi colab. (1939) Vick Roy (1985) Vick Roy (1985) Vick Roy (1985) Lockwood (1979) Vick Roy (1985)

Tabelul 8.3

Studii de fermentaţie continuă pentru producerea acidului lactic

Sistem	Bibliografie
Lb. bulgaricus, Lb. casei	Whittier şi Rogers (1931)
Lb. delbrueckii, glucoză, extract de drojdii şi ioni minerali	Luedeking şi Piret (1959)
Lb. Delbrueckii, hidrolizat de amidon	Childs şi Welsby (1966)
Lb. Delbrueckii, glucoză, extract de drojdii	Hanson şi Tsao (1972)
Lb. bulgaricus, fermentatoare în serie, zer	Keller şi Serhardt (1975)
Lb. Delbrueckii imobilizat în alginat de calciu, coloana fluidă folosind glucoză şi extract de drojdii	Stenroos şi colab.(1982)
Lb. Delbrueckii	Vick Roy şi colab.
Lb. Bulgaricus	Mehaia şi Cheryan (1986)
Lb. Bulgaricus	Mehaia şi Cheryan (1987)

Metodele convenţionale de fermentaţie discontinue sau continue necesită separarea celulelor de mediu la sfârşitul fiecărui proces. Pe de altă parte, imobilizarea celulelor pe suporturi solide sau pe o matrice de gel duce la apariţia rezistenţei la difuzie şi pierderilor asociate cu imobilizarea. Pentru a preveni aceste limite, a fost studiată utilizarea bioreactorelor cu membrană reciclabilă şi a membranelor cu fibre „hollow".

Inhibiţia prin produs final în procesul de fermentaţie a acidului lactic şi efectele asupra productivtăţii acidului lactic au fost studiate de diferiţi autori. S-a stabilit că, datorită inhibiţiei, avantajele fermentaţiei continue nu sunt valabile în obţinerea acidului lactic şi, cu excepţia concentraţiilor foarte scăzute de substrat, rata specifică de creştere a microorganismelor devine mai dependentă de concentraţia produsului decât de concentraţia substratului. De aceea, procesele care îndepărtează produsul din mediul de fermentaţie pot îmbunătăţi eficienţa sistemului. Friedman şi Saden (1970) au folosit sisteme de dializă în cultură, care au îndepărtat acidul lactic din mediu. Sistemul a menţinut o concentraţie scăzută de lactat după o fază de *lag*, ducând la îmbunătăţirea ratelor de creştere specifice şi a producţiei de acid lactic. Autorii pretind că aceste rezultate confirmă efectul inhibitor al produsului final în fermentaţia lactică. Stieber şi colab. (1977) au arătat că, pentru producerea acidului lactic, fermentaţia continuă în bioreactoare cu membrană de dializă, spre deosebire de procesele continue şi discontinue, permite utilizarea unui substrat mai concentrat şi creşterea eficienţei conversiei substratului. Monitorizarea variabilelor procesului este de o importanţă majoră în cadrul fermentaţiei.

Un sistem „semi-on-line" cu flux discontinuu, care studiază fermentaţia lactică, a fost imaginat de către Nielsen şi colab. (1989). Într-un fermentator controlat de computer au fost măsurate concentraţiile şi densitatea optică ale glucozei, acidului lactic şi proteinelor. Autorii au arătat că răspunsul sistemului a fost rapid şi sigur, el putând fi folosit pentru studierea modelelor matematice de fermentaţie.

Acidul lactic produs în procesul de fermentaţie trebuie recuperat sau extras şi purificat. Câteva probleme de fermentaţie îngreunează acest lucru. De exemplu, pentru a controla *p*H-ul fermentaţiei lactice, sunt adăugaţi compuşi ca amoniacul, carbonatul de calciu şi hidroxidul de sodiu. Carbonatul de calciu precipită lactatul de calciu, care poate stânjeni producerea din acid lactic a unui material cu un anumit grad de polimerizare. Îndepărtarea acidului lactic din mediul de fermentaţie poate fi o soluţie a acestei probleme, prin împiedicarea scăderii *p*H-ului mediului. Printr-un sistem cunoscut de tip „extracţie lichid–lichid" utilizând amine, se poate realiza îndepărtarea acidului lactic din mediul de fermentaţie [San Martin şi colab., 1992]. Yabannavar şi Wang (1991) au studiat producerea fermentativă–extractivă a acidului lactic de către *Lb. delbrueckii* utilizând amine terţiare (Alamim 336) şi oleilalcool la *p*H acid.

8.2.3.1. Imobilizarea bacteriilor lactice

Imobilizarea bacteriilor lactice poate facilita recuperarea culturilor bacteriene starter pentru a fi reutilizate în procesul de fermentație. Utilizarea culturilor mixte de microorganisme ridică problema stabilirii condițiilor optime pentru mai mult decât o specie microbiană în același proces. Kurosawa și colab. (1988) au coimobilizat, în perle de alginat de calciu, mucegaiul producător de α-amilază în condiții de aerobioza, *Aspergillus awamori* Nakasawa IFO 4033 și *Sc. lactis* IFO 12007, o bacterie anaerobă aerotolerantă. Mucegaiul crește în apropiere de suprafața perlelor, unde este o zonă aerobă. Bacteria crește în partea centrală a perlelor, unde cantitatea de oxigen este limitată. Utilizând amidonul ca sursă principală de carbon, concentrația finală de acid lactic a fost de 25 g/l, cu un randament al producției de acid lactic de 66%.

Prin utilizarea de microorganisme imobilizate în faza de creștere și prin electrodializă s-a obținut acid lactic. Lacroix și colab. au studiat proprietățile reologice într-o fermentație discontinuă, cu tulpina *Lb. casei* imobilizat. Groboillot și colab. (1993) au imobilizat *Lactococcus lactis* prin microîncapsulare, utilizând legarea încrucișată de interfață de chitosan. Toxicitatea agentului de încrucișare a fost observată în timpul microîncapsulării prin pierderea activității celulare. Autorii au sugerat necesitatea unui agent de încrucișare compatibil pentru a asigura viabilitatea microbiană în timpul procesului. Mehaia și Cheryan (1987) au imobilizat *Lb. bulgaricus*, într-un bioreactor tip „hollow fiber", în scopul producerii de acid lactic din zer, într-o fermentație continuă. Autorii au indicat că difuzia substratului și separarea produșilor sunt îngreunate de barierele fizice dintre substraturi și celule. Performanțe mai bune au fost obținute utilizând un bioreactor cu membrană și reciclarea celulelor.

Bügükgüngor a imobilizat *Lb. bulgaricus* în K-carrageenan, arătând că acest suport are o stabilitate mecanică și chimică mai bună decât cea oferită de gelurile alginat. Bassi și colab. au măsurat capacitatea de difuzie a acidului lactic într-un gel membrană de agaroză. O analiză a transferului de masă în fermentația acidului lactic de către celule imobilizate de *Lb. delbrueckii* în K-carrageenan a fost prezentată de Yabannavar și Wang.

8.2.4. Tehnologia de obținere a acidului lactic și a sărurilor sale

Acidul lactic, în cantități mari, se poate obține prin fermentație, cu bacterii selecționate, pe medii de cultură având la bază materii prime naturale: făină de porumb, cartofi, melasă, zer de lapte.

Fermentația lactică a glucidelor decurge după următoarea reacție, exprimată în formule brute:

$$\underset{\text{Glucoză}}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{Acid lactic}}{2C_3H_6O_3}$$

Întrucât bacteriile producătoare de acid lactic sunt sensibile în mediu acid, se adaugă în timpul fermentației carbonat de calciu. În urma fermentației lactice rezultă, astfel, un amestec de acid lactic și lactat de calciu. Pentru obținerea lactatului de calciu, se efectuează o neutralizare completă cu carbonat de calciu, urmată de izolarea și purificarea lactatului de calciu prin diferite procedee:

$$2CH_3{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + CaCO_3 \longrightarrow (CH_3{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}{-}COO)_2Ca$$

8.2.4.1. Procedee de obținere a acidului lactic

Literatura de specialitate referitoare la obținerea acidului acetic (și implicit a sărurilor sale) este foarte numeroasă și descrie diverse alternative îmbunătățite ale procedeului clasic.

În general, sunt redate metode moderne de obținere a acidului lactic în bioreactoare cu strat filtrant. Acestea sunt echipate cu membrane filtrante care imobilizează celulele de *Streptococcus faecalis*, operate continuu timp de două săptămâni.

Obținerea acidului lactic cu celule imobilizate de *Lactobacillus spp.* este inhibată de concentrația substratului (glucoza), concentrația în acid lactic, *p*H-ul fermentației și de câteva săruri ale acidului lactic. Când concentrația substratului este mai mare de 10%, *p*H-ul 4,0 și concentrația acidului lactic 6–7 mg/ml, producția de acid lactic este inhibată. Dintre săruri, lactatul de calciu nu are efect inhibitor, spre deosebire de lactatul de sodiu; când ionul este NH_4^+, efectul este variabil, depinzând de tulpina utilizată.

Ca materii prime, în fermentația lactică, se utilizează diferite varietăți de glucoză precum și materii prime ce conțin amidon, cum ar fi făina de porumb, terciul de cartofi.

În afară de făina de porumb, ca materie primă se mai utilizează melasa fermentată cu *Lactobacillus salivarius*. Parametrii optimi pentru fermentația lactică în acest caz au fost stabiliți la *p*H = 5,6 și la 46°C. Adăugarea de 0,5% extract de drojdie reduce timpul de fermentație și crește producția de acid lactic cu 30%.

Zerul este folosit, de asemenea, în producția de acid lactic utilizând ca microorganism *Lactobacillus bulgaricus*. În mediul de cultură se adaugă extract de drojdie și săruri minerale. Acidul lactic s-a separat din mediul de fermentație prin cromatografie de schimbători de ioni și s-a purificat prin ultrafiltrare.

Producerea lactatului de calciu pentru uz medical şi dietetic se poate obţine şi prin hidroliza enzimatică şi fermentaţia făinii de orez.

Acidul lactic, obţinut prin biosinteză, se găseşte în mediul final de fermentaţie în concentraţie de 10–15%; există diverse procedee de izolare şi purificare a acidului lactic şi a sărurilor sale din mediul de fermentaţie, până la obţinerea acestora sub formă de preparate de diferite grade de puritate. Unele procedee recomandă o purificare sumară a acestora şi apoi utilizarea în industria alimentară. În scopul utilizării în industria farmaceutică, este însă necesară o purificare avansată. Astfel, acidul lactic este izolat din mediul de fermentaţie, prin tratarea acestuia cu floculanţi organici, condiţiile optime de floculare a celulelor bacteriene şi substanţelor coloidale fiind adesea: *p*H = 7, temperatura 65°C şi concentraţia de floculant de 0,08 g/l. Acidul lactic purificat este recuperat din soluţia limpede prin centrifugare şi apoi utilizat ca atare.

O. Hitomi (1989) descrie o metodă de purificare avansată a acidului lactic din mediul de fermentaţie. Acidul lactic este purificat ieftin şi continuu din mediul de fermentaţie conţinând săruri alcaline şi alcalino-pământoase ale acidului lactic prin îndepărtarea bacteriilor, cromatografie pe răşini schimbătoare de cationi, concentrare până la 80% a acidului lactic şi distilare a concentratului la presiune redusă. Mediul de fermentaţie conţinând lactat de sodiu (obţinut în bioreactor) s-a tratat cu DIAION SK 1B (schimbător de cationi); concentrarea până la 90% şi distilarea la 130°C a condus la obţinerea acidului lactic de înaltă puritate.

Acelaşi colectiv descrie un procedeu de purificare a acidului lactic din mediul de fermentaţie, precum şi aparatura aferentă. Procedeul comportă mai multe etape:

– trecerea mediului de fermentaţie pe o răşină schimbătoare de cationi pentru desalinizare;
– adsorbţia acidului lactic pe o răşină schimbătoare de anioni;
– eluarea acidului lactic de pe coloană cu un acid puternic.

Acidul lactic din lichidul de fermentaţie s-a neutralizat cu NH_3, rezultând lactat de amoniu; lichidul s-a decolorat, apoi s-a filtrat prin răşina schimbătoare de anioni. Cationitul s-a regenerat cu soluţie de H_2SO_4 1n, iar anionitul s-a regenerat cu NaOH 1n.

O variantă de prelucrare a mediului de cultură după fermentaţie cuprinde următoarele etape:

– reacţia Maillard în prezenţa sărurilor de magneziu ($MgSO_4$, $MgCl_2$ sau $MgCO_3$);
– floculare cu săruri de magneziu sau fier ori cu complecşi;
– prima adsorbţie cu cărbune activ sau ulei;
– a doua adsorbţie cu PAM (răşină schimbătoare de ioni).

Purificarea acidului lactic din mediul de fermentație cu făină de porumb se realizează cu îndepărtarea impurităților proteice, glucidelor reziduale și a altor contaminanți prin precipitarea lactatului de calciu. Metoda utilizează adsorbanți, adjuvanți de precipitare, cum ar fi varul, $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$. Randamentul poate fi mărit cu 10–20%.

Un procedeu de purificare a acidului lactic fără cristalizare este aplicat în China (Wang Zhang) și cuprinde următoarele etape:

– reacția cu hidroxilamină (reacția Maillard) în prezența sărurilor de metale alcaline drept cristalizatori;
– decolorarea pe cărbune activ (1%);
– floculare cu amestec: sare de Mg–CaO;
– decolorare pe cărbune activ;
– procedee convenționale: evaporare, concentrare, filtrare, schimbători de ioni.

Această metodă reduce durata de izolare și mărește cantitatea și calitatea acidului lactic purificat.

Komori Akiyoshi descrie un procedeu de separare și purificare a acidului lactic prin cristalizarea lactatului de magneziu din soluțiile brute, dizolvarea în apă și tratarea cu H_2SO_4, răcire, îndepărtarea $MgSO_4$ rezultat și îndepărtarea $MgSO_4$ rezidual cu rășini schimbătoare de ioni; astfel, lactatul de magneziu s-a dizolvat în apă, s-a amestecat cu 75% H_2SO_4, 30 minute la 30°C, s-a răcit, s-a filtrat la 25°C și s-a tratat cu Amberlite 120 B și s-a concentrat până la 90,5% acid lactic.

O altă variantă de recuperare a acidului lactic din mediul de fermentație, descrisă de același colectiv, constă în convertirea totală a acidului lactic în sarea sa de magneziu și evaporarea soluției la 50°C. Lactatul de magneziu cristalizat este reconvertit în acid lactic cu o rășină schimbătoare de ioni. Astfel, 5 l lichid de cultură filtrat conținând 8,3 mg/ml acid lactic obținut prin cultivarea lui *Rhizopus oryzae* în prezență de MgO s-a concentrat prin evaporarea până la 1 l, la temperatura de 80...90°C, rezultând 87% cristale de lactat cu particule de 30–200 μ. Sarea s-a dizolvat în apă caldă și s-a trecut pe Amberlite IR 120 B (H^+) pentru a obține acid lactic.

Creșterea producției de lactat de calciu a fost realizată de Maslowski (1989) prin mărirea concentrației substratului și precipitarea lactatului de calciu pe parcursul fermentației, echilibrul fiind astfel deplasat în direcția produsului final. Astfel, fermentația a 26% zaharoză cu *Thermobacterium cereale* la 50°C și la pH = 6,3, menținut prin adăugare de CaO, a condus la precipitarea continuă a lactatului de calciu. Randamentul de conversie a fost de 99,6% după 3 zile.

Pentru extracția acidului lactic din mediul de fermentație se mai utilizează o tehnologie combinată de electrodializă cu schimbători de ioni. Prin această metodă, randamentul de acid lactic poate ajunge la 85%, în comparație cu 50% obținut prin tehnologia care utilizează metoda precipitării lactatului de calciu.

Astfel, Heriban V. recomandă utilizarea pe scară largă a electrodializei, în purificarea acidului lactic și a lactatului de sodiu [Heriban V. și colab., 1993]; în

ambele cazuri se realizează o concentrare de 4 ori a acidului lactic, chiar în timpul fermentației. Pentru a obține un produs de înaltă puritate se recomandă o decolorare, urmată de o reacție de dublu schimb.

Un alt colectiv (Lee şi colab.) descrie producerea acidului lactic şi lactatului de sodiu prin fermentație cu *Lactobacillus delbrueckii* pe un mediu conținând glucoză, extract de drojdie, săruri minerale, la 42°C cu menținerea *p*H-ului la 7,2 prin adăugarea de NaOH până la atingerea concentrației în lactat de sodiu de 24,8 g/l. În acest punct adăugarea de NaOH s-a oprit, iar *p*H-ul mediului s-a lăsat să scadă la 4,22. Mediul a fost trecut printr-un filtru şi apoi printr-un schimbător de ioni, recuperarea acidului lactic din mediu fiind mai rapidă decât viteza de formare a acestuia; acidul lactic recuperat din coloană indică o productivitate de 0,98 g/l/h.

O metodă de recuperare a acidului lactic prin cromatografie de schimb ionic, din mediul de fermentație [Mantovani şi colab., 1993], constă în trecerea lichidului de fermentație filtrat pe o coloană schimbătoare de anioni în forma carbonat şi eluarea acidului lactic cu $(NH_4)_2CO_3$. Ulterior $(NH_4)_2CO_3$ este îndepărtat din soluție prin încălzire. Apoi, soluția este trecută pe un schimbător de ioni puternic acid, în forma H^+. După concentrarea eluatului din a doua răşină, s-a obținut o soluție apoasă conținând 90% acid lactic.

Pentru concentrarea acidului lactic se foloseşte fenomenul de osmoză inversă, utilizând un concentrator tubular cu membrană fină, specială pentru osmoză inversă. Fluxul creşte liniar cu presiunea aplicată pe membrană şi este relativ neafectat de debit. Presiunea osmotică a unei soluții de 1% lactat a fost de 280–560 kPa, depinzând de *p*H sau de gradul de disociere. Respingerea creşte cu aplicarea presiunii şi *p*H-ul ridicat conduce la o descreştere a fluxului (datorat în parte presiunii osmotice mari) şi o creştere semnificativă a rejecției. La *p*H peste 5,6, rejecția lactatului şi a glucidelor reziduale a fost 97%; cu membrane de acetat de celuloză, fluxul a fost în general mai mic şi rejecția lactatului a fost proporțională cu gradul de disociere la presiune joasă.

Procedeul de obținere a acidului lactic cu tulpini de *Lactobacillus delbrueckii*, descris în continuare, a fost stabilit în cadrul Institutului de Cercetări Chimico Farmaceutice Bucureşti (ICCF) [Jurcoane Şt. şi colab., 1994].

Procedeul cuprinde: faza de hidroliză enzimatică a materiilor prime, fermentația propriu-zisă şi purificarea acidului lactic şi a sărurilor sale.

Materiile prime utilizate în faza de hidroliză şi fermentație au fost: mălai furajer, fosfat de amoniu şi carbonat de calciu.

Pentru hidroliza amidonului din făina de porumb s-au utilizat preparatele enzimatice comerciale: Thermamyl 120L şi SAN Super 240 L, achiziționate de la firma NOVO (Danemarca). Primul preparat enzimatic conține, în principal, α-amilază termorezistentă din *Bacillus licheniformis*. Aceasta produce o lichefiere a amidonului din porumb, transformându-l într-un amestec de dextrine solubile, gradul de hidroliză al amidonului fiind de cca 20%. Al doilea preparat enzimatic

(SAN) conține în principal β-amilază, realizând hidroliza amidonului dextrinizat cu Thermamyl, până la maltoză și glucoză.

Experiențele de hidroliză enzimatică a făinii de porumb s-au efectuat în condițiile optime stabilite, care sunt prezentate în continuare.

Dextrinizarea (lichefiere). Prima fază a operației de hidroliză a amidonului s-a efectuat în condiții de laborator, stabilindu-se următorii parametri de lucru:

- concentrația enzimei Thermamyl:
  - raportată la substrat: (*E*/*S*): 0,46% (v/g);
  - raportată la greutatea suspensiei: 0,42% (v/g);
- *p*H optim de acțiune: 6,5;
- temperatura de lucru și timpul de acțiune { 80°C (3 ore); 110°C (30 min).

Menținerea amestecului de reacție timp de 30 de minute la 110°C se efectuează pentru sterilizarea mediului și inactivarea enzimei, înaintea celei de a doua faze de hidroliză.

Hidroliza până la glucoză și maltoză (zaharificare – termen uzual pentru această operație). Cea de-a doua fază a operației de hidroliză a amidonului se efectuează în același vas, după răcirea amestecului de reacție rezultat la faza de dextrinizare până la 65°C; condițiile optime stabilite pentru această fază sunt:

- concentrația enzimei SAN:
  - raportată la substrat: (*E*/*S*): 0,61% (v/g);
  - raportată la greutatea suspensiei: 0,057% (v/g);
- *p*H optim de acțiune: 5,5;
- temperatura de lucru: 65°C;
- timpul de acțiune: 10 ore.

Controlul analitic al procesului de hidroliză enzimatică s-a efectuat prin determinarea la diferite intervale de timp a glucidelor reducătoare eliberate. S-a urmărit, de asemenea, *p*H-ul și reacția cu iod (pentru identificarea amidonului) pe parcursul hidrolizei.

Experiențele de fermentație în laborator au fost efectuate în flacoane Erlenmayer de capacitate 3 l, în condiții statice, la temperatură constantă (42°C), pe un mediu de cultură cu următoarea compoziție:

- glucoză (din hidrolizatul de mălai) 10–12% (ca glucide reducătoare);
- fosfat diamoniacal 0,1%;
- carbonat de calciu 1% (inițial).

*p*H-ul fermentației s-a menținut în intervalul 3,8–5,2 prin corecție cu suspensie de $CaCO_3$.

Pe parcursul fermentației (durata totală: 96 ore) s-a determinat concentrația în glucide reducătoare, concentrația acidului lactic format și concentrația lactatului

BCU "Ion Creangă" LIBRARY

de calciu. Mediul de cultură inițial s-a însămânțat (raportul de inoculare 7%) cu inocul de 24 ore cu următoarea compoziție:

- bacto-Difco-peptonă: 0,5%;
- dextroză: 1%;
- extract de drojdie Difco: 2%;
- KH_2PO_4: 0,2%;
- *p*H: 6,7–6,8.

Microorganismul producător a fost *Lactobacillus delbrueckii* cultivat și selecționat în cadrul secției Biosinteze din ICCF.

După faza de biosinteză în mediul de fermentație, concentrația acidului lactic a fost de 9–10 %. Mediul de cultură filtrat de corpii bacterieni s-a concentrat până la 50% acid lactic, produsul rezultat fiind numit „acid lactic de uz tehnic", utilizat în industria pielăriei ca mordant. Purificarea acidului lactic, până la calitatea de uz farmaceutic, s-a realizat printr-un procedeu cu schimbători de ioni.

8.2.4.2. Izolarea și purificarea lactatului de calciu

În vederea izolării și purificării lactatului de calciu din mediul de fermentație este necesară o bună separare a corpilor bacterieni. În mediul de cultură, la sfârșitul fermentației există un amestec de acid lactic (cca 2–4%) și lactat de calciu (6–7%). Există două posibilități de prelucrare a acestui amestec:

- neutralizarea acidului lactic cu $Ca(OH)_2$ rezultând lactat de calciu, separarea biomasei și a excesului de $Ca(OH)_2$ și $CaCO_3$ (rămas în urma neutralizării incomplete pe parcursul fermentației), decolorarea cu cărbune activ;
- separarea biomasei, urmată de decolorare și apoi neutralizare cu $Ca(OH)_2$ și filtrare.

Întrucât o bună decolorare cu cărbune activ a lichidului de cultură are loc în mediu acid (*p*H = 4–5), varianta a doua este mai avantajoasă.

Rezultatele satisfăcătoare în ceea ce privește viteza de filtrare și clarificarea lichidului de cultură s-au obținut în următoarele condiții:

- încălzirea mediului de fermentație la 60...70°C, cu agitare (are loc o coagulare parțială a biomasei și denaturarea diferitelor proteine din mediu);
- floculareа: sub agitare se adaugă aproximativ 0,5% floculant tensioactiv Moldosil; se lasă 30 de minute fără agitare pentru floculare;
- filtrarea sub vid cu 1% adjuvant de filtrare (de exemplu: Perlită);
- lichidul de cultură rezultat, perfect limpede, de culoare galbenă și *p*H = 4–4,5, este supus în continuare operației de decolorare cu cărbune activ și apoi este neutralizat acidul lactic aflat în amestec cu lactatul de calciu.

Pentru **decolorare** s-a utilizat cărbune activ CF-2, care s-a testat la diverse *p*H-uri ale lichidului de cultură filtrat și în diferite proporții. S-a considerat că cea mai avantajoasă variantă de decolorare a lichidului de cultură este cu 1,5% cărbune activ CF-2 la *p*H = 4.

O bună decolorare a soluției de acid lactic și lactat de calciu se realizează la *p*H = 4, temperatură 60°C, cu agitare timp de o oră, prin adaos de cărbune CF-2 în proporție de 1%.

Întrucât soluția obținută după filtrare și decolorare conține un amestec de acid lactic și lactat de calciu, este necesară neutralizarea acidului lactic cu o sare de calciu sau cu hidroxid de calciu. Reacția de neutralizare s-a efectuat sub agitare continuă și energică, la temperatura de 70°C, timp de o oră.

Neutralizarea cu $CaCO_3$ a decurs lent, fiind incompletă după o menținere prelungită la temperaturi între 70...90°C.

Reacția de neutralizare cu $Ca(OH)_2$ decurge rapid, timpul de o oră fiind necesar doar pentru definitivarea reacției.

Cantitatea de $CaCO_3$ sau $Ca(OH)_2$ ce trebuie adăugată pentru neutralizare se calculează conform reacțiilor:

$$2CH_3{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + CaCO_3 \longrightarrow (CH_3{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}{-}COO)_2Ca + H_2CO_3$$

90 100 218

$$2CH_3{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + Ca(OH)_2 \longrightarrow (CH_3{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}{-}COO)_2Ca + 2H_2O$$

90 74 218

Cantitatea de acid lactic existentă în mediul de cultură se determină și după neutralizare.

*p*H-ul mediului după neutralizare trebuie să fie cuprins între 6,5 și 7.

Experiențele de concentrare a soluției de lactat de calciu de la 10–11% până la 25–30% s-au efectuat în laborator pe un rotavapor sub vid tip Büchi.

Operațiile de cristalizare–recristalizare s-au efectuat în două variante de lucru:

- cristalizare din soluția apoasă în care se află dizolvat lactatul de calciu;
- cristalizare din alcool etilic apos.

Efectuarea cristalizării și recristalizării în apă a condus la un produs necorespunzător din punct de vedere al conținutului în cloruri și sulfați.

Datorită solubilității mari în apă (1g/20g apă), în această variantă de lucru nu este posibilă spălarea cristalelor cu apă. De asemenea, pentru obținerea unor randamente de izolare a produsului cât mai mari este necesară respectarea anumitor condiții în această fază.

Cristalizarea lactatului de calciu în alcool etilic și spălarea cristalelor cu alcool etilic rece conduc, în final, la un produs corespunzător utilizării ca medicament.

Recristalizarea s-a efectuat prin dizolvarea cristalelor în apă distilată la 80°C (astfel încât să rezulte o soluție 20% lactat de calciu) și după răcire s-a precipitat cu alcool etilic în raport de ½ (v/v).

Uscarea. Cristalele de lactat de calciu uz farmaceutic s-au uscat sub vid, prin ridicarea treptată a temperaturii (de la 30 la 60°C) timp de 24 ore.

8.2.5. Aplicații practice

Acidul lactic este produs de animale, plante şi microorganisme, fiind un hidroxiacid organic natural cu multe utilizări în procese alimentare, chimice, farmaceutice, industriale. Aproximativ jumătate din acidul lactic produs este utilizat în industria alimentară ca acidulant şi aproximativ jumătate din acidul lactic produs în întreaga lume este prelucrat prin procese fermentative. Acidul lactic există în două forme optic active: D(–) levogiră şi L(+) dextrogiră. Lockwood şi colab. au arătat că esterii şi sărurile acidului lactic L(+) sunt levogire. Ambii izomeri există în sistemul biologic şi acidul lactic rezultat prin fermentaţie se găseşte, în general, sub forma unui amestec racemic. Soccol şi colab. au arătat că izomerul L(+) este cel mai important pentru industria alimentară, fiind singurul pe care organismul uman îl poate asimila sub acţiunea L(+) lactat dehidrogenazei.

Prelucrarea comercială sintetică a acidului lactic a început în S.U.A., dar Thorne a arătat că acest tip de producţie avea deja loc şi în Japonia. Acidul lactic poate fi transformat în produse chimice importante ca etanol, propilen glicol, polimeri acrilici şi poliesteri. Ambalaje de plastic biodegradabil pot fi produse dintr-un copolimer de acid lactic.

Caracteristicile diferitelor tipuri de acid lactic comercializat sunt indicate în tabelul 8.4, iar în tabelul 8.5 sunt prezentate câteva dintre cele mai importante utilizări ale acidului lactic.

Tabelul 8.4

Caracteristicile acidului lactic

Proprietăți	Caracteristici
Activitate optică	Există ca izomer L(+), D(–) şi amestec racemic
Cristalizare	Formează cristale monoclinice, mai puţin colorate, de puritate înaltă
Culoare	Incolor
Miros	Nu
Consistenţă	Sirop lichid
Solubilitate	Solubil în orice proporţie
Miscibilitate	Miscibil cu apă, alcool, glicerol, furfurol Insolubil în cloroform
Volatilitate	Scăzută
Esterificare	În soluţie > 20% formează un dimer ciclic sau un polimer linear
Fizice	Greutate moleculară = 90,1; punct de fierbere 122°C la 15 mm Hg; α = 1,2; punctul de topire 18°C, accelerație gravitațională 1,248

Tabelul 8.5

Tipuri calitative de acid lactic comercializat
(După Lockwood, 1979; Vick Roy, 1985.)

Produs	Puritate	% Aciditate totală	Caracteristici
Farmaceutic	Foarte mare	85%	Tehnologie de preparare laborioasă; incolor; 30% polimerizat
Alimentar	Medie	≈ 50	Galben deschis
Tehnic	Foarte mică	44–45	Concentrații mai mari de contaminanți, de exemplu: glucide, sulfați, cenușă, cloruri

Rolul fermentației lactice în biodegradarea și în bioconversia unor produși este foarte important. Multe dintre aceste operații sunt înrudite cu producția compușilor folosiți în hrana animalelor. Lockwood a arătat care sunt aspectele economice ale producției comerciale de acid lactic.

Una dintre aplicațiile acidului lactic care are un impact ecologic și biotehnologic deosebit este folosirea sa în producția materialelor plastice biodegradabile. Din punct de vedere nutrițional, izomerii D(−) și L(+) ai acidului lactic au efecte diferite. În timp ce L(+) este metabolizat în gluconeogeneză, aceasta fiind calea urmată de acidul lactic produs în metabolismul uman, D(−) este excretat sau oxidat în ficat. S-a demonstrat că D(−) poate să producă reacții nedorite la copiii mici. Se recomandă ca și adulții să-și limiteze consumul de acid lactic D(−) până la 100 ml/kg corp/zi. Unul din produșii care aduc acidul lactic D(−) în dietă este varza acră.

În zootehnie lactatul de calciu se folosește ca aditiv furajer în amestec cu porumb, carbonat și fosfat de calciu.

Un aditiv pentru hrana animalelor se obține prin amestecarea pulberii de zeolit cu zahăr, aminoacizi, acid lactic și H_2O.

Competiția pentru substraturi și inhibiția prin metaboliți. În majoritatea bioproceselor care fac apel la o fermentație lactică și recurg la cultivarea în amestec de tulpini, din specii și chiar din genuri diferite, asocierea tulpinilor ridică problema interacțiunii lor. Dacă aceste interacțiuni sunt benefice pentru una sau mai multe tulpini, aceasta este o dovadă a cooperării. Dacă ele sunt dăunătoare aceasta este o dovadă a inhibiției. Compararea comportamentelor metabolice (viteză de creștere sau de acidifiere sau de producere a metaboliților specifici) ale tulpinilor cultivate singure sau în amestec constituie criteriile cele mai des folosite în determinarea numărului de interacțiuni.

Atunci când mai multe tulpini de bacterii lactice sunt cultivate în același mediu, ele intră în mod obligatoriu în competiție dacă folosesc același intermediar. Competiția se poate declanșa chiar și pentru un component de substrat; de

exemplu, în cazul culturilor mixte de *Sc. thermophilus* şi *Lb. helveticus*, pe lactoză, streptococul asimilează greu galactoza şi asemenea lactobacilului asimilează mai întâi glucoza. Deci, există în special la începutul fermentaţiei o competiţie în utilizarea simultană a aceluiaşi substrat. În plus, s-a dovedit că galactoza care este inhibitor competitiv al galactozidazei induce inhibiţia anumitor tulpini de *Sc. thermophilus*. Faptul că o cantitate mică de galactoză este consumată de acest streptococ explică inhibiţia acestor bacterii spre sfârşitul creşterii lor în cultura mixtă de lactobacili termofili, la un *p*H constant. Totuşi, producţia acidului lactic rămâne cea mai importantă dintre cauzele inhibiţiei activităţilor metabolice ale bacteriilor lactice în culturile mixte. Acidul produs se găseşte în soluţie şi este supus următoarei reacţii:

$$CH_3CHOH\ COOH + H_2O \Leftrightarrow CH_3\ CHOH\ COO^- + H_3O^+$$

În mediu acid predomină forma moleculară. Din contră, în mediu alcalin sau neutru mai importantă cantitativ este forma ionizată. Aceste două forme stau la originea celor două tipuri de inhibiţie, dintre care unul sau altul poate deveni dominant, în funcţie de condiţiile de *p*H. Dacă *p*H-ul nu e menţinut constant, inhibiţia este exercitată de ionul H_3O^+. Dacă *p*H-ul este reglat la un nivel slab acid, de exemplu *p*H = 6, ionul $CH_3\ CHOH\ COO^-$ este prezent într-o cantitate mai mare şi inhibiţia seamănă cu una datorată excesului de concentraţie salină. Aceste două sisteme de inhibiţie, inhibiţia prin ionul H_3O^+ şi inhibiţia datorată excesului de concentraţie salină, sunt foarte diferite şi pot să nu aibă acelaşi efect pe culturi mixte. Se poate lua exemplul culturii mixte de *Sc. thermophilus* şi *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*:

– dacă *p*H-ul nu este reglat, lactobacilul continuă să crească chiar şi după stagnarea creşterii streptococului;

– dacă *p*H-ul este reglat (între 5,5 şi 6,5), creşterea celor două tulpini se opreşte în acelaşi timp. La *p*H reglat dispare inhibiţia prin ioni H_3O^+ care, în mod obişnuit, este funcţie de specie.

Fenomene de cooperare metabolică. Contribuţia prin producţia de nutrienţi azotaţi. Bacteriile lactice au foarte mare nevoie de nutrienţi azotaţi, constatându-se, de asemenea, că aportul exogen de aminoacizi şi de peptide cu greutate moleculară mică stimulează creşterea şi producţia de acid, în special a *Sc. thermophilus*. S-a arătat că lactobacilii termofili au o pronunţată capacitate proteolitică şi produc, pe baza proteinelor complexe, compuşi azotaţi cu greutate moleculară mică. Astfel, se poate explica şi stimularea *Sc. thermophilus* cultivat în asociere cu *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* sau cu *Lb. helveticus*.

Importanţa proteazelor a fost subliniată şi în cazul lactococilor, ale căror tulpini sunt adesea constituite din două populaţii diferite, una care produce proteaza, varianta Prt^+, cealaltă lipsită de protează, varianta Prt^-. Cultivată singură, varianta Prt^- este stimulată de adăugarea unui hidrolizat de cazeină, ceea ce

conduce la ipoteza că în mediile naturale creşterea unor astfel de organisme este stimulată de produsele de proteoliză ale variantei Prt^+.

Cooperarea prin modificarea condiţiilor de mediu. În timpul unei fermentaţii lactice au loc simultan două fenomene importante: scăderea *p*H-ului mediului şi eventuala eliminare a compuşilor inhibitori. În culturile mixte, scăderea *p*H-ului este, de obicei, mai rapidă şi mai pronunţată, ceea ce se explică prin stimularea a cel puţin uneia dintre tulpinile amestecului. Pentru că bacteriile lactice sunt în majoritate organisme facultativ anaerobe, orice factor care diminuează concentraţia de oxigen dizolvat în mediul de cultură le stimulează creşterea şi favorizează producţia de acid lactic. Astfel, prezenţa într-un amestec de tulpini a bacteriilor care acceptă concentraţii mari de oxigen dizolvat (cum sunt *Ec. faecalis*, *Lb. mesenteroides*, *Lb. plantarum*) favorizează tulpinile mai puţin tolerante.

Cooperarea prin producerea de metaboliţi specifici. În cazul culturilor mixte de bacterii lactice termofile s-a arătat că acidul formic produs de *Sc. thermophilus* poate sta la originea stimulării *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus*. Într-adevăr, acidul formic este implicat în sinteza de adenină, compus care stimulează creşterea lactobacilului. Pe de alta parte, *Sc. thermophilus* poate stimula producţia de acid a *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* prin intermediul CO_2 pe care-l produce, favorizând sinteza acidului aspartic de către lactobacili. Producţia de CO_2 de către *Sc. thermophilus* în lapte se datorează în parte activităţii unei ureaze care descompune ureea din mediu.

8.2.6. Biosinteza bacteriocinelor

Abilitatea bacteriilor lactice de a produce bacteriocine a fost prezentată pentru prima dată în 1928 de către Rogers pentru *Lactococcus lactis* şi *Lactobacillus bulgaricus*. Bacteriocinele formează o clasă de substanţe antibiotice cu acţiune bactericidă, sintetizate de anumite tulpini bacteriene, datorită informaţiei genetice conţinute în structura unor plasmide. Încercările de a defini cadrul conceptului de bacteriocine nu a dus la o soluţie universal acceptată, ci numai la stabilirea unor criterii, în general aplicabile bacteriocinelor produse de bacteriile Gram-pozitive, şi anume:

- bacteriocinele au un spectru de activitate limitat, centrat în jurul speciei omoloage;
- modul de acţiune esenţial al bacteriocinelor este bactericid;
- conţin totdeauna o componentă biologic activă de natură proteică;
- se leagă de celule sensibile prin intermediul unor receptori celulari specifici;
- sinteza bacteriocinelor, ca şi imunitatea celulei-gazdă, este asigurată de gene plasmidiale;
- biosinteza bacteriocinelor are efect letal pentru celula producătoare.

Bacteriocinele sunt prezente întotdeauna în cantități mici în culturile de bacterii lactice. Producția lor crește în urma procesului de producție, care poate fi declanșat cu aceleași tratamente care măresc frecvența inducției lizogene. Ca rezultat al inducției, celula producătoare moare, ca și în cazul bacteriilor infectate cu fagi virulenți.

8.2.7. Probiotice

Microorganismele vii utilizate ca probiotice, în alimentația animală, sunt tulpini bacteriene aparținând grupurilor *Lactobacillus*, *Enterococcus* și *Bacillus* și eventual drojdii din genul *Saccharomyces*.

Lactobacillus și *Enterococcus* sunt genuri bacteriene prezente în cantități importante (10^4–10^8/g) în microflora digestivă a porcilor, vacilor și păsărilor. Din contră, tulpinile din genul *Bacillus* și drojdiile nu sunt locuitori obișnuiți ai florei digestive. Dacă ameliorarea obținută prin ingestia de proteine este clasic admisă, mecanismele de acțiune, în ceea ce privește organismele vii, sunt și în prezent controversate, acestea trebuind să îndeplinească o serie de condiții pentru a putea acționa benefic asupra organismului animal. Pentru ca un microorganism să poată fi utilizat ca probiotic trebuie să întrunească o serie de criterii prealabile, și anume:

- condiții specifice de implantare;
- rezistență la lizozim;
- toleranță la aciditatea gastrică;
- rezistență la săruri biliare.

8.2.7.1. Condiții de implantare a microorganismelor de tip probiotice

Microorganismele utilizate ca probiotice trebuie să depășească, în principal, trei obstacole majore în scopul tranzitării digestive, înainte de implantarea și multiplicarea în intestinul subțire:

- în gură, ele sunt supuse acțiunii litice a lizozimului, prezent în cantitate mare în salivă;
- în stomac, trebuie să reziste la acțiunea unui *p*H foarte acid;
- în intestinul subțire, trebuie să reziste la acțiunea sărurilor biliare.

Rezistența la enzimele litice. Printre enzimele litice capabile de a liza peretele celular al bacteriilor Gram-pozitive, lizozimul pare a fi o enzimă deosebit de agresivă. Lizozimul este o β 1-4-glucanază care scindează specific legăturile β 1-4 dintre acidul muramic și resturile glucozaminice din partea glucidică a peptidoglicanului, care reprezintă 80–90% din substanța uscată a peretelui celular al bacteriilor.

Microorganismele Gram-pozitive prezintă o sensibilitate deosebită la acțiunea lizozimului, care poate liza chiar și celule aflate în faza staționară de creștere, când pereții celulari sunt îngroșați. Acțiunea litică a lizozimului este

potențată de către tripsină, care are rol benefic prin hidroliza părții peptidice a peptidoglicanului din peretele celular, favorizând accesul lizozimului la scindarea legăturilor β 1-4 dintre acidul muramic și N acetilglucozamina.

Bacteriile lactice posedă însă o rezistență naturală la efectul litic al lizozimului, ceea ce permite trecerea lor prin bariera bucală. Rezistența naturală a bacteriilor lactice poate fi explicată prin modificarea structurală a pereților celulari, semnalată la *Lactobacillus bulgaricus*, când peretele celular este sensibil la activitatea enzimelor autolitice, dar nu și a lizozimului.

Rezistența la *p*H-ul gastric. Pentru evaluarea toleranței tulpinilor la activitatea stomacală, tulpinile sunt supuse acțiunii unui suc gastric artificial, la *p*H = 3 și la temperatura de 37°C. În aceste condiții, bacteriile lactice au prezentat o viabilitate de 100%, timp de 3 ore, în timp ce *Bacillus subtilis* și drojdia metilotrofă *Hansenula polymorpha* au prezentat o viabilitate cuprinsă între 50 și 70%

Rezistența la sărurile biliare. Rezistența bacteriilor față de sărurile biliare se determină pe medii selective conținând bilă. Tulpinile care se dezvoltă pot fi considerate gazde obișnuite ale intestinului. Există o relație strânsă între rezistența tulpinii la sărurile biliare și capacitatea de a coloniza intestinul subțire.

În concluzie, pentru ca o bacterie lactică să poată fi utilizată ca aditiv alimentar, cu rol de probiotic, este necesară o rezistență simultană la acidul gastric, la atacul enzimelor digestive și la acțiunea antibacteriană a sărurilor biliare.

Efectele probioticelor. Efectele probioticelor pot fi clasificate în efecte directe și efecte indirecte. Dintre efectele indirecte se menționează:

- acidifierea mediului;
- eliberarea de substanțe antibiotice și alți metaboliți cu acțiune antibacteriană;
- efectele enzimatice;
- efectele parietale;
- efectele imunomodulatoare;
- efectele de excludere competitivă a florei patogene;
- efectele nutriționale directe.

Efectele indirecte, ale căror mecanisme sunt încă neelucidate, pot fi:

- efecte asupra tranzitului intestinal;
- protecție ecologică de echilibrare a florei endogene;
- efect sanitar.

Probioticele induc în tubul digestiv al animalelor o serie de reacții utile, printre care acidifierea mediului este de importanță majoră. La rândul ei, reacția acidă inhibă formarea de amine toxice și permite producerea de substanțe antibiotice. Este inhibată, de asemenea, multiplicarea germenilor patogeni de tipul colibacililor și salmonelelor. Enzimele conținute în probiotice pot ameliora digestia propriu-zisă și pot corecta unele deficiențe digestive ca, de exemplu, cele apărute în digestia lactozei.

Se poate constata un efect nutriţional direct prin aportul de microorganisme în tubul digestiv, în cazul drojdiilor, acestea fiind o sursă *in vivo* de proteină, vitamine, aminoacizi.

Dintre efectele indirecte, se remarcă efectul sanitar al probioticelor, acestea intervenind în refacerea apărării naturale a sănătăţii, în condiţii de stres.

Acidifierea mediului digestiv. Lactobacilii formează rapid acid lactic din glucide şi în special din lactoză, ceea ce duce atât la diminuarea diareii la tineretul animalier, cât şi la o protecţie antimicrobiană împotriva salmonelelor sau a altor bacterii patogene sensibile la *p*H scăzut.

Producţia de acizi organici (lactic şi acetic) de către lactobacili este regulatorul primar al activităţii florei intestinale. Acidul lactic produs va fi metabolizat, la rândul său, de bacteriile utilizatoare de lactat, la acid formic, care va conduce la scăderea *p*H-lui în tractul intestinal, inhibând dezvoltarea microorganismelor patogene acido-sensibile. Concomitent creşte concentraţia formelor moleculare ale acizilor slabi, acidul acetic şi formic care penetrează în celule exercitând un puternic efect inhibitor. În această fază, teoretic, ar fi benefică prezenţa unei drojdii, care este capabilă să metabolizeze acidul formic pentru a nu se forma o concentraţie excesivă, locală, cu efect dăunător.

Metaboliţi cu acţiune inhibitoare. Componentele inhibitoare eliminate de lactobacili cuprind producerea de bacteriocine şi metaboliţi toxici ai oxigenului şi acizilor organici.

Spectrul inhibitor al bacteriocinelor este diferit. Majoritatea lor inhibă bacteriile Gram-pozitive din genul *Lactobacillus* sau genuri înrudite taxonomic cu acesta. Alte bacteriocine ca, de exemplu: bulgaricina, acidolina, lactocidina, acidofilina şi reuterina (substanţă neproteică) sunt active faţă de un spectru larg de bacterii, drojdii şi fungi. Între substanţele cu activitate antibacteriană se disting substanţe nepeptidice şi bacteriocine dotate cu un situs activ de natură proteică. Din prima categorie face parte reuterina produsă de *Lactobacillus reuteri*, care are proprietăţi de antibiotic cu spectru larg faţă de: bacterii Gram-pozitive, Gram-negative, drojdii, protozoare. Reuterina este un derivat de glicero-β-hidroxipropion-aldehida.

Proprietăţile biochimice ale bacteriocinelor, structura şi natura lor, sunt determinate genetic, prezentând o mare variabilitate.

Biosinteza bacteriocinelor apare în timpul sau la sfârşitul fazei exponenţiale de creştere a tulpinii producătoare. În general, ele sunt produse extracelulare, dar o parte a activităţii antimicrobiene poate fi reţinută pe celule.

Acţiunea bacteriocinelor asupra celulelor microbiene este un proces în două etape. Prima fază este adsorbţia bacteriocinelor pe receptori specifici sau nespecifici ai bacteriei-gazdă. În acest timp, bacteriocinele sunt sensibile la acţiunea proteazelor. A doua faza, ireversibilă, induce schimbări patologice în celula-ţintă specifică fiecărui bacteriocid. Acest proces a fost descris pentru bacterii Gram-pozitive, dar nu este clar dacă este aplicabil şi bacteriilor lactice.

Dintre metaboliții toxici ai oxigenului o importanță deosebită o are apa oxigenată. Aceasta, împreună cu sistemul lacto-peroxidaz-tiocianat, exercită un efect bacteriocid asupra majorității microorganismelor patogene.

Efectele enzimatice. Enzimele conținute în probiotice și vehiculate pe cale orală pot fi active în intestin. Astfel, câteva bacterii lactice ingerate în alimentația umană o dată cu produsele lactate fermentate participă la digestia lactozei în cazurile cu deficiență în lactază. *Saccharomyces cerevisiae* ajută la digestia zaharozei la copiii cu deficiență în sucrază. Prezența în probiotice a unor spori de *Bacillus* înalt producători de lipază, amilază și protează poate crește digestibilitatea unor furaje, mărind gradul de asimilare al acestora. Prin eliminarea de enzime digestive este favorizată digestia avansată a lipidelor, proteinelor și glucidelor în tractul digestiv. Prezența concomitentă a unei specii de *Bacillus* cu propietăți de producător de enzime digestive, cât și litice, și a unei tulpini de drojdie cu pereți celulari sensibili la atac litic, poate contribui la îmbogățirea substanțială a mediului intestinal cu proteine, aminoacizi, vitamine, fosfor, calciu, magneziu, fier, provenite prin digestia *in vivo* a acesteia.

Efectele parietale. Câteodată, microorganismele în tranzit pe tractul intestinal pot influența activitatea enterocitelor. Astfel, ingestia de *Saccharomyces boulardii* eliberează câteva enzime pe mucoasa intestinală.

Efectele imunomodulatoare. Câteva tulpini din genul *Bacillus* exercită efecte imunomodulatoare. Administrarea unei doze puternice de bacterii stimulează producerea de gama interferon, prin limfocitele circulante. Administrarea câtorva tulpini de lactobacili la nou-născuți atenuează gastroenteritele, stimulează imunitatea și diminuează semnificativ durata diareelor.

Prezența bacteriei *Sacharomyces boulardii* în tractul digestiv exercită un efect pozitiv asupra sistemului imunitar, favorizând secreția și producerea de anticorpi, în special imunoglobuline A, în lumenul intestinal.

Studii recente cu diferite specii de *Bacillus* au pus în evidență stimularea sistemului limfocitar de tip uman. S-a demonstrat că acestea pot produce *in vivo* un tip de antibiotic – bacitracina – și pot coexista cu tulpini din genul *Lactobacillus*, dar fără ca tulpina de *Bacillus* să producă mai mult antibiotic.

Alte experiențe sugerează o activitate antitumorală rezultată din activarea sistemului imunitar. Rezultate semnificative au fost obținute, de asemenea, și cu compuși ai pereților celulari ai bacteriilor lactice, cum ar fi glicopeptide provenite din lizate celulare de *Lactobacillus bulgaricus* sau peptidoglicani (muramil-peptide).

Efectele de inactivare a unor compuși toxici. Inactivarea unor compuși toxici, prin intermediul bacteriilor lactice, reprezintă un alt aspect important al acțiunii directe a probioticului în terapia cu bacterii lactice. Când microflora intestinală nu este echilibrată, se pot acumula fenol și indol rezultate din procesul de putrefacție. Acești compuși toxici sunt prezenți în mod normal într-o condiție fiziologică bună, dar în cazul disfuncțiilor hepatice se pot acumula în sânge

producând intoxicații. S-a demonstrat experimental că reechilibrarea microflorei intestinale cu bacterii lactice permite reducerea concentrațiilor de fenol și indol. Trebuie subliniat faptul că bacteriile lactice, cum ar fi *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* și *Lacococcus lactis* ssp. *lactis*, au o foarte mare capacitate de a degrada aflatoxina B_1, considerată ca una dintre cele mai toxice substanțe pentru organism.

Efectele de excludere competitivă a florei patogene. Adesea, probioticele au capacitatea de a supraviețui în intestin și de a adera la epiteliul intestinal. Probioticele secretă substanțe antimicrobiene, acide sau bacteriocine. Aceasta permite explicarea efectelor protectoare asupra florei endogene și antagonice vizavi de cele patogene. Sunt de notat efectele pozitive în domeniul prevenirii și tratamentului unor infecții intestinale cu *Clostridium difficile*.

Studii recente au evidențiat că *Lb. casei* favorizează un răspuns imunitar împotriva infecțiilor datorate rotavirusurilor și că administrarea de culturi liofilizate în lapte sau lactoseruri fermentate de *Lb. casei* permite înlăturarea diareilor datorate rotavirusurilor. Laptele fermentat și preparatele farmaceutice, care conțin un mare număr de bacterii lactice vii, constituie un antidot eficace împotriva infecțiilor enteritice, a căror frecvență astăzi este în creștere la turiști și călători. Într-un context general, acțiunea bacteriilor lactice asupra germenilor enteropatogeni este de natură terapeutică sau profilactică și trebuie avută în vedere în scopul protecției consumatorilor.

Efectele protective ale bacteriilor lactice în tratamentul cu antibiotice. Adesea, probioticele protejează semnificativ efectele indezirabile ale terapiei cu antibiotice. Un interes deosebit în acest sens îl deține *Sacharomyces boulardii*, *Streptococcus faecium 5F68* și câțiva lactobacili.

Practic, toate familiile de antibiotice, cu excepția vancomicinelor și a celor conținând monoglucide, sunt susceptibile de a provoca diaree, cu frecvențe variabile în special în cazul speciilor anaerobe din flora dominantă și la concentrații ridicate ale antibioticelor. Presiunea selectivă a antibioticelor se exercită asupra microflorei digestive, care la nivel fiziologic formează un ecosistem bazat pe un echilibru armonios al florei intestinale și al mucoasei digestive. Acest echilibru rezultă din mecanisme complexe în care flora microbiană exercită o acțiune fiziologică asupra gazdei, ca sinteza vitaminelor, degradarea glucidelor, lipidelor și proteinelor alimentare, având impact asupra reînnoirii celulelor cu rol în tranzitul intestinal. De asemenea, o serie de factori ai gazdei – ca acela al mecanismelor imunologice, secreția IgA, peristaltismul intestinal, tipurile de alimentație – influențează și controlează echilibrul microbian digestiv. În acest sistem interactiv, flora bacteriană normală, formată din 10^{14} bacterii și aparținând la peste zece specii, exercită un efect de barieră sau rezistență la colonizare, care se opune implantării de bacterii; flora strict anaerobă, cea mai abundentă, dominantă joacă un rol major.

În terapia specifică destinată să reechilibreze flora intestinală perturbată drastic de către tratamentul cu antibiotice s-au propus corecții ale concentrațiilor electrolitice asociate cu aportul de microorganisme nepatogene, selecționate ca probiotice, care să realizeze un nou echilibru ecologic intestinal. Pentru a fi potențial eficiente, este important ca aceste microorganisme să poată trăi în tubul digestiv la nivel satisfăcător, pentru a crea efectul de barieră. Aceste microorganisme trebuie să fie insensibile la principalele antibiotice utilizate în tratamente curente.

Există câteva specii microbiene care sunt acceptate ca preparate antidiareice. Dintre acestea două sunt drojdii, și anume: *Saccharomyces boulardii* și *Saccharomyces cerevisiae*, iar șase sunt bacterii: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus cereus I.P.5832*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium longum*.

Efectele sanitare profilactice. Condițiile de îngrijire, stresul la înțărcarea vițeilor de lapte sau la transportul mai lung al animalelor, infecțiile intercurente sunt capabile să favorizeze implantarea și invazia organismului cu bacterii patogene: *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium* etc. Rolul probioticelor ar consta în refacerea apărării naturale a stării de sanătate. Sunt posibile trei tipuri de mecanisme:

- creșterea rezistenței prin colonizarea tubului digestiv;
- reducerea translației bacteriene patogene la nivelul ganglionilor limfatici intestinali;
- stimularea imunității locale.

8.2.7.2. Obținerea probioticelor bacteriene utilizate în hrana animalelor

Termenul de probiotic a fost utilizat pentru prima oară în 1965 de către Lilly și Sillwell, pentru a defini „organisme sau substanțe care contribuie la echilibrul microbian al intestinului".

Probioticele sunt culturi selecționate și concentrate de bacterii lactice, aparținând, de regulă, tulpinilor de *Lactobacillus acidophilus* și *Streptococcus faecium* sau de *Bacillus*.

Probioticele administrate în dieta animalelor favorizează devoltarea, previn și tratează anumite boli, cresc producția de lapte, diminuează stresul la înțărcare, față de martorii cu dietă lipsită de acestea.

Lactobacilii necesari probioticelor sunt prezenți în: produsele lactate acide, unt, brânzeturi, smântână, bere, vin, suc de legume, plămezi de la fabricarea spirtului.

Probioticele, după o administrare orală, sunt capabile să se colonizeze în tractul digestiv și să păstreze sau să determine o creștere a florei naturale digestive, prevenind dezvoltarea microorganismelor patogene și asigurând securitatea utili-

zării optime a hranei. Ca parte a florei naturale, exercită efecte pozitive prin intermediul excluderii competitive şi a producţiei de substanţe antimicrobiene (se produce acid lactic, care reduce *p*H-ul interstinal, devenind nefavorabil pentru anumite bacterii patogene şi favorizând activităţi enzimatice).

Microorganisme utilizate în producţia industrială de probiotice. Cele mai utilizate microorganisme ca probiotice fac parte din genurile *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*.

Pentru obţinerea probioticelor se folosesc microorganisme selecţionate. În ceea ce priveşte alegerea optimă a unui microorganism probiotic, trebuie avute în vedere, pe cât posibil, următoarele:

– tulpina microbiană trebuie să prezinte rezistenţă faţă de enzimele litice salivare şi din tubul digestiv;

– să aibă rezistenţă la *p*H-ul scăzut din stomac mai mult de câteva ore;

– să fie rezistentă la acţiunea sărurilor biliare (în mod normal, microflora autohtonă nu prezintă probleme);

– probioticul trebuie să producă un *p*H scăzut pentru a preveni dezvoltarea germenilor patogeni şi pentru a reduce producerea de toxine şi alte substanţe nedorite;

– să fie rezistentă la antibioticele adăugate în hrană;

– tulpina microbiană utilizată trebuie să prezinte capacitate de aderare la celulele peretelui intestinal;

– bacteriile trebuie să se afle în stare vie (uşor de proliferat *in vivo* şi *in vitro*);

– este importantă rezistenţa microorganismului utilizat ca probiotic în procesul tehnologic de obţinere a preparatului final.

Materii prime utilizate pentru dezvoltare. Se ştie că laptele constituie mediul ideal pentru întreţinerea şi cultivarea lactobacililor; ei cresc, deci, foarte bine pe mediul de lapte, dar şi pe alte medii, cum ar fi: plămezi amidonoase de porumb sau cartof, zaharificate; zerul de la fabricarea brânzeturilor, melasă.

Bacteriile lactice fermentează următoarele glucide: glucoza, fructoza, galactoza, manoza, ramnoza, arabinoza, xiloza.

Condiţii de cultivare şi obţinere a probioticelor

Obţinerea culturii stoc şi a culturii de lucru. Culturile stoc se întreţin pe medii nutritive agarizate repartizate în tuburi înclinate. Mediul de întreţinere se stabileşte pentru fiecare microorganism în parte. De exemplu, pentru microorganismul *Lactobacillus delbrueckii* se foloseşte mediul cu următoarea compoziţie:

– extract de malţ: 4%;

– agar de malţ: 2%;

– *p*H = 6,8; sterilizare: 120°C, 30 min.

Obținerea inoculului. Pentru obținerea unui inocul se folosește un mediu lichid având compoziția:

- peptonă: 0,5%;
- glucoză: 1%;
- extract de drojdie: 2%;
- *p*H = 6,7–6,8, sterilizare la 110°C, 20 min.

Se repartizează în flacoane de capacitate 750 ml, câte 250 ml mediu per flacon.

Mediul inoculat se incubează la 38°C pe masa vibratoare cu agitare, timp de 48 de ore.

Fermentația la flacoane. Pentru fermentația la nivel de flacoane, se utilizează un mediu cu compoziția:

- extract de porumb: 4%;
- glucoză: 5%;
- săruri minerale: 0,5%.

Se pregătește un mediu de fermentație cu extract de porumb și glucoză, repartizând câte 50, 100, 200 ml/flacon. După sterilizare și răcire se însămânțează cu câte 10% inocul, menținându-le apoi static la 38...39°C timp de 48 de ore. În timpul celor 48 de ore se corectează *p*H-ul cu carbonat de calciu.

Se urmărește în timp fermentația, determinându-se numărul de celule de lactobacili/ml.

Biosinteza la nivel micropilot. Pentru biosinteza la nivel micropilot se alege un mediu optim de biosinteză, stabilit în laborator, și apoi se stabilesc parametrii optimi de cultivare în bioreactor (temperatură, *p*H, concentrație, O_2 dizolvat) prin efectuarea de șarje în diferite condiții.

Pe parcursul biosintezei se urmărește din 3 în 3 ore creșterea numărului total de germeni/ml (NTG/ml). Când acesta devine $>10^7$, se consideră că biosinteza este încheiată.

Prelucrarea mediului de cultură. Probioticele obținute din drojdii și bacterii se prezintă sub formă de pulbere, lichid, pastă sau granulate. Pulberea se obține fie prin uscare în tăvi și apoi mojarare, fie prin atomizare. Se obțin produse ale căror NTG = 10^6–10^7 germeni/g.

Titrul de viabilitate variază de la un produs la altul și trebuie specificat de fiecare dată, fiind necesar în testările pe animale.

Testarea probioticelor în hrana animalelor. Probioticele se adaugă în special în hrana animalelor tinere, urmărindu-se efectul bioproductiv și starea de sănătate a animalelor.

Cultura de bacterii se adaugă într-un furaj (porumb, soia, făină de carne) în proporție de 1×10^3, 1×10^4 sau 1×10^6 germeni/gram hrană.

Cultura de bacterii intensifică semnificativ conversia hranei, creșterea uniformă a corpului și producția de carne, comparativ cu martorii.

În tabelul 8.6 sunt prezentate câteva produse probiotice comercializate pe plan mondial.

Tabelul 8.6

Produse probiotice comercializate pe piața mondială

Produsul	Firma	Bacteriile conținute	Recomandările producătorului	
			Specia/ Categoria	Efecte benefice
ALL-LAC	Alltech.Inc.- S.U.A.	Lactobacili	Tineret porcin	Reduce mortalitatea Crește sporul mediu zilnic
PROTEXIN	Probiotics Int. M.Britanie	*S. faecium*, *S. thermophillus*, *Bifidobacterium bifidum*, *L.acidophillus*, *L. bulgaricus*	Cabaline, ovine, porcine	Profilactic antistres, anti *E.coli*/ *Salmonella* Îmbunătățește performanțele productive
PROBIOS	Pioneer Hi-Bred	*L.acidophillus*, *L.casei*, *L.plantarum*, *S.faecium*	Viței, porcine	Îmbunătățește starea de sănătate și performanțele productive
TOYOCERIN	Toyo-Iozo Japonia	*Bacillus toyoi*	Porci, păsări	Reprimă dezvoltarea germenilor patogeni Atenuează stresul

Modul de acțiune al probioticelor. S-au emis mai multe ipoteze, dar în principal trebuie avute în vedere următoarele:

– probioticele inhibă proliferarea bacteriilor patogene prin producerea de acizi organici și prin reducerea *p*H-ului;

– produc apă oxigenată și previn aderarea bacteriilor patogene la peretele intestinului;

– prin enzimele proprii, probioticele măresc utilizarea digestivă a hranei, precum și procesele de detoxifiere;

– probioticele stimulează producția sistemului imunologic, acționând ca barieră de protecție a tubului digestiv, fiind demonstrat că administrarea de preparate cu *Lactobacillus* poate stimula producția de gamaglobuline;

– probioticele stimulează producția de vitamine aparținând în general grupului B și determină creșterea activității lactozei și maltozei;

– proliferează în tractul digestiv și sunt în competiție cu bacteriile patogene.

9. BIOPROCESE AEROBE

9.1. OBȚINEREA PRIN BIOSINTEZĂ A ACIZILOR ORGANICI

Un număr mare de acizi organici se formează în procesul de degradare anaerobă a glucidelor şi al oxidării incomplete a acestora. Plecând de la aceste observaţii, s-au studiat posibilităţile de obţinere la scară industrială, prin tehnologii biochimice, a acizilor carboxilici, a hidroxiacizilor, aminoacizilor. În prezent, tehnologiile biochimice sunt utilizate pe scară largă pentru obţinerea de acizi organici.

Astfel, se obţin industrial acizi mono- şi policarboxilici (acid acetic, acid propionic, acid itaconic), acizi monohidroxi-monocarboxilici (acid lactic), acizi monohidroxi-policarboxilici (acid citric) şi acizi polihidroxi-monocarboxilici (acid gluconic).

În procesul de biosinteză se folosesc medii de cultură conţinând melasă, amidon, maltoză, glucoză, surse de azot, săruri minerale, pe care se cultivă microorganisme din clasa bacteriilor şi fungilor, producătoare de acizi carboxilici. Astfel, cultivând microorganismul *Aspergillus niger* pe un mediu cu melasă, s-au obţinut o serie de acizi carboxilici al căror conţinut este determinat de compoziţia chimică a mediului de cultură şi de durata fermentaţiei (fig. 9.1).

Pentru dirijarea procesului de fermentaţie spre un anumit acid se folosesc microorganisme specifice, cultivate pe un mediu adecvat.

BCU "IOAN SLAVICI" UNIVERSITY LIBRARY

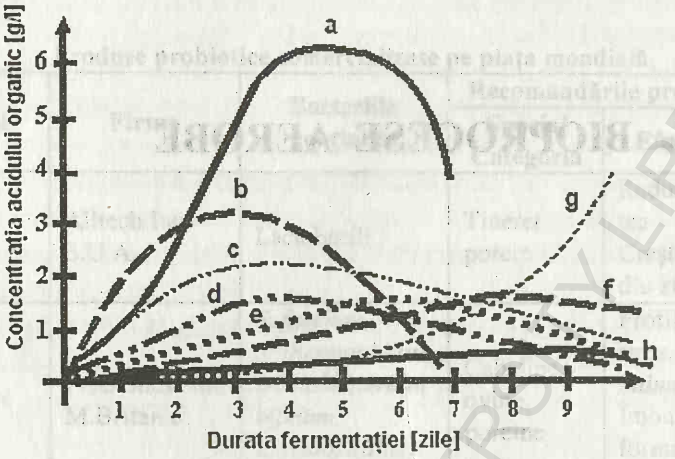


Fig. 9.1. Biosinteza acizilor organici cu *Aspergillus niger*:
a – acid malonic; *b* – acid succinic; *c* – acid malic; *d* – acid zaharic; *e* – acid gluconic; *f* – acid aconitic; *g* – acid oxalic; *h* – acid fumaric.

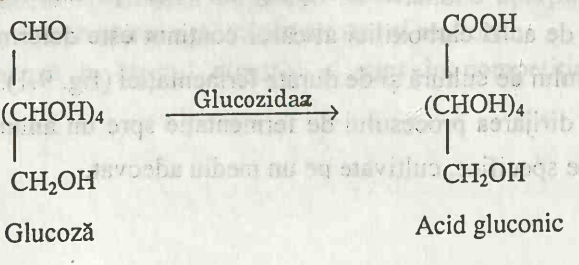
9.1.1. Tehnologia acidului gluconic

Acidul gluconic se utilizează în industria farmaceutică pentru prepararea gluconatului de calciu, medicament utilizat în tratamentul rahitismului, al hipocalcemiei, al spasmofiliei.

Acidul gluconic se poate obține prin oxidarea glucozei pe cale chimică, electrochimică sau biochimică. Prin metoda chimică se folosesc ca agenți de oxidare: apă de clor, apă oxigenată, nu se obține un produs pur, întrucât molecula de glucoză se rupe nespecific, rezultând un amestec de acizi organici.

Prin metoda electrochimică se foloseşte oxigenul rezultat în urma electrolizei apei şi procedeul este foarte scump datorită consumului de energie electrică; oxidarea este, de asemenea, nespecifică.

Procedeul biochimic de oxidare a glucozei (fig. 9.2) este cel mai comod şi ieftin de obținere a acestui produs. În plus, reacția este specifică, fiind realizată de enzima glucozoxidază. Din reacție nu rezultă produşi secundari.



Pentru oxidarea biochimică a glucozei la acid gluconic au fost descrise procedee de fermentație de suprafață, care durează 11–12 zile și au loc cu randamente mici, de 70–80%. Cu timpul, aceste procedee au fost înlocuite cu procedee de fermentație în profunzime (adică procedee submerse), care utilizează microorganisme din genul *Aspergillus*.

În mediul de cultură, conținând 20–30% glucoză, sursa de azot organic (extract de porumb), uree, substanțe minerale ($MgSO_4 \cdot 7H_20$, KH_2PO_4, $NH_4H_2PO_4$) se cultivă microorganisme din clasa fungilor, de obicei *Aspergillus niger*, la temperaturi între 25 și 28°C și la un *p*H de 6,5.

Pe parcursul fermentației, *p*H-ul se corectează cu soluție de NaOH 40%, dacă se dorește obținerea gluconatului de sodiu sau cu $Ca(OH)_2$, dacă se intenționează obținerea gluconatului de calciu.

$$2CH_2OH-(CHOH)_4-COOH+Ca(OH)_2 \rightarrow$$
$$\rightarrow (CH_2OH-(CHOH)_4-COO)_2Ca+2H_2O$$

$$2CH_2OH(CHOH)_4-COOH+NaOH \rightarrow CH_2OH(CHOH)_4-COONa+H_2O$$

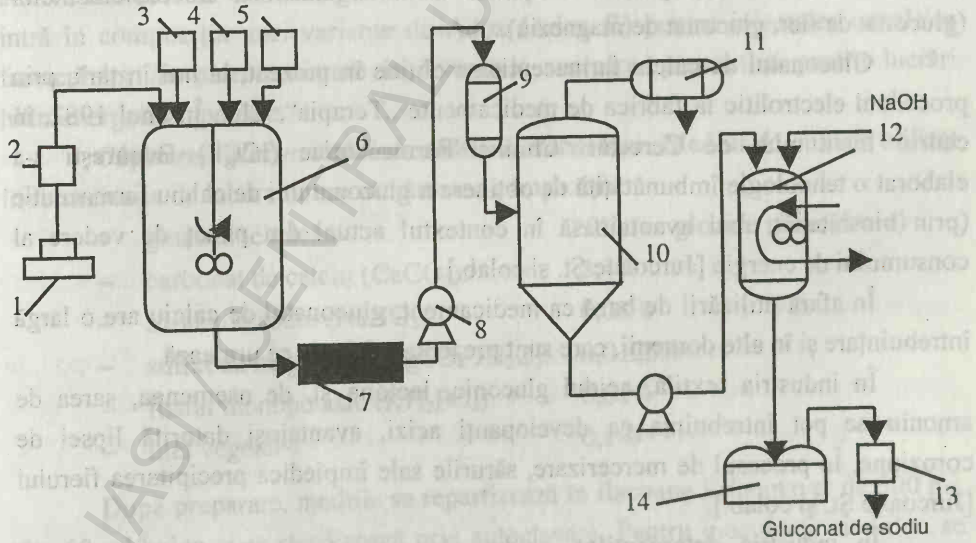


Fig. 9.2. Instalație de producere a acidului gluconic prin biosinteză:
1 – compresor; *2* – filtru de aer; *3* – rezervor mediu de cultură; *4* – rezervor soluție NaOH; *5* – rezervor antispumant; *6* – fermentator; *7* – filtru-presă; *8* – pompă; *9* – rezervor; *10* – concentrator; *11* – condensator; *12* – reactor neutralizare; *13* – cristalizator; *14* – moară cu bile. (După Oniscu, 1978.)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După terminarea fermentației, mediul se filtrează pe filtrul-presă pentru separarea biomasei. Soluția obținută se concentrează în evaporatorul pelicular, după care este trimisă în aparatul de neutralizare cu NaOH sau $Ca(OH)_2$, iar de aici la cristalizare într-un cristalizator răcit cu solă la 2...3°C. Sarea acidului gluconic se purifică suplimentar prin recristalizare.

Pentru obținerea acidului gluconic s-au cercetat și posibilitățile utilizării bacteriilor. S-au pus la punct procedee de cultivare cu *Acetobacter oxydans* și *Acetobacter gluconicum*, astfel încât în prezent, la scară industrială, se folosesc atât procedeele de cultivare a fungilor, cât și cele de cultivare a bacteriilor.

9.1.1.1. Obținerea gluconatului de calciu cu tulpina *Aspergillus niger ICCF*

Sărurile acidului gluconic au o largă întrebuințare în farmacie, datorită toxicității reduse și capacității de a fi bine tolerate de organismul uman.

Gluconatul de calciu este astfel mult folosit ca atare sau sub formă de gluconolactat de calciu, în cazuri de deficiență de calciu. Diferite alte săruri metalice sunt indicate pentru introducerea în organism a microelementelor (gluconat de fier, gluconat de magneziu).

Gluconatul de calciu farmaceutic se obține în prezent, la noi în țară, prin procedeul electrolitic la fabrica de medicamente „Terapia", Cluj. În anul 1982, în cadrul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice (ICCF) București s-a elaborat o tehnologie îmbunătățită de obținere a gluconatului de calciu farmaceutic (prin biosinteză), mai avantajoasă în contextul actual din punct de vedere al consumului de energie [Jurcoane Șt. și colab.].

În afara utilizării de bază ca medicament, gluconatul de calciu are o largă întrebuințare și în alte domenii, care sunt prezentate în cele ce urmează.

În industria textilă, acidul gluconic, lactona și, de asemenea, sarea de amoniu se pot întrebuința ca developanți acizi, avantajoși datorită lipsei de coroziune. În procesul de mercerizare, sărurile sale împiedică precipitarea fierului [Jurcoane Șt. și colab.].

În industria detergenților, acidul gluconic și sărurile sale, în special gluconatul de calciu, găsesc un teren vast de aplicare, datorită proprietăților de a împiedica precipitarea calciului și a magneziului, în cazul folosirii apelor cu duritate mai mare. Sunt deosebit de utili în special în cazul spălării mecanizate, deoarece combat corodarea aparaturii.

În industria produselor lactate, acidul gluconic se poate întrebuința în instalațiile de spălare, pentru a împiedica precipitarea așa-zisei „pietre de lapte",

precum şi în industria berii, pentru a preveni formarea depozitelor instabile din instalaţie.

În industria pielăriei se poate întrebuinţa acidul gluconic în tăbăcirea cu fier şi aluminiu, deoarece sub formă de gluconaţi aceste metale nu precipită înainte de a atinge punctul izoelectric al pielii. Gluconatul de litiu se poate întrebuinţa ca material tanant în pregătirea pieii albe.

Un alt domeniu de utilizare este industria fotografică, unde este necesară împiedicarea precipitării developanţilor alcalini prin adaosuri de gluconaţi.

În industria alimentară se poate folosi pentru a întârzia râncezirea produselor ce conţin grăsimi. De asemenea, lactona se pretează foarte bine pentru prepararea prafurilor de copt, fiind superioară acidului tartric şi sărurilor sale, deoarece pune în libertate mai uniform dioxidul de carbon.

În zootehnie, gluconatul de calciu reprezintă o sursă adecvată de calciu pentru viţei, păsări etc.

În construcţii, sărurile acidului gluconic (de calciu şi sodiu), datorită proprietăţilor lor de întârziere a prizei cimentului, se utilizează la prepararea unor aditivi necesari în fabricarea cimenturilor speciale. Astfel, gluconatul de calciu intră în compoziţia unei variante de Adox (Adox R) pentru injectarea canalelor fasciculelor de precomprimare la centralele nucleare, precum şi pentru lucrări hidroenergetice speciale.

Obţinerea gluconatului de calciu în laborator. Mediul de cultură utilizat în fermentaţia de laborator are următoarea compoziţie:

- glucoză tehnică: 20% (ca glucide reducătoare)
- carbonat de calciu ($CaCO_3$): 3,4%
- azotat de sodiu ($NaNO_3$): 0,05%
- sulfat de magneziu ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$): 0,0125%
- fosfat monopotasic (KH_2PO_4): 0,01%
- ulei vegetal : 0,1%

După preparare, mediile se repartizează în flacoane Erlenmayer de 500 ml, câte 50 ml/balon şi se sterilizează prin autoclavare. Pentru inocularea mediilor, se utilizează o suspensie de spori a tulpinii *Aspergillus niger* ICCF. Baloanele cu mediu însămânţate sunt incubate la termostat (35°C) pe agitatorul rotativ (turaţie – 220 rot/min).

Pentru urmărirea evoluţiei bioprocesului, se iau probe din 8 în 8 ore, la care se determină conţinutul în glucoză netransformată la timpul respectiv, precum şi cantitatea de gluconat de calciu formată.

Obținerea acidului gluconic în stații pilot. Compoziția mediului de cultură utilizat în experimentările pilot este cea indicată în paragraful anterior pentru experiențele de laborator.

Mediile se prepară dizolvând glucoza în apă caldă; cantitatea de apă utilizată în acest scop se calculează astfel încât să fie aproximativ jumătate din cantitatea totală necesară pentru pregătirea mediului de cultură. Sărurile se dizolvă fiecare separat, turnându-se soluțiile respective peste soluția de glucoză, se aduce mediul la volumul de 50 litri, apoi se introduce în fermentatorul de 90 litri; se adaugă ulei vegetal ca antispumant și se sterilizează timp de 30 min la 110°C.

După răcire, se adaugă suspensia de carbonat de calciu și se însămânțează cu 10% inocul vegetativ pregătit în laborator; se stabilesc următorii parametri de lucru:

- presiunea în bioreactor: 2 bar;
- debitul de aer: 0,7 l aer/1 mediu/min;
- turația agitatorului: 280 rot/min;
- temperatura: 35°C.

Pentru urmărirea procesului și a dinamicii de oxidare biochimică a glucozei cu tulpina *Aspergillus niger* ICCF, se iau probe de mediu din 8 în 8 ore, în care se determină: concentrația glucozei, *p*H-ul mediului, concentrația în gluconat de calciu, aspectul microorganismului. Dacă *p*H-ul mediului scade sub valoarea 5, se adaugă o suspensie de carbonat de calciu sterilizată, pentru corecție, până la valoarea 6,5.

După 30–40 ore concentrația glucozei scade sub 0,5%, aproximativ 94% din cantitatea de glucoză fiind transformată în gluconat de calciu, a cărei concentratie devine 9–10%.

În vederea izolării gluconatului de calciu, mediul de cultură se filtrează, în scopul separării biomasei, după care soluția nativă se concentrează până la 20–30 % gluconat și apoi se supune operației de cristalizare, prin răcire la 4...5°C, sub agitare continuă.

O altă variantă de recuperare a gluconatului de calciu din mediul de cultură este uscarea prin atomizare; se obține un produs tehnic, din care ulterior se pot obține, prin purificare, diferite calități de gluconat de calciu (fig. 9.3). Produsul de puritate 99%, comercializat sub denumirea „calciu gluconic", se obține prin decolorare cu cărbune activ, cristalizare și recristalizare în alcool etilic a soluției perfect limpezi rezultate în urma filtrării biomasei din mediul de fermentație.

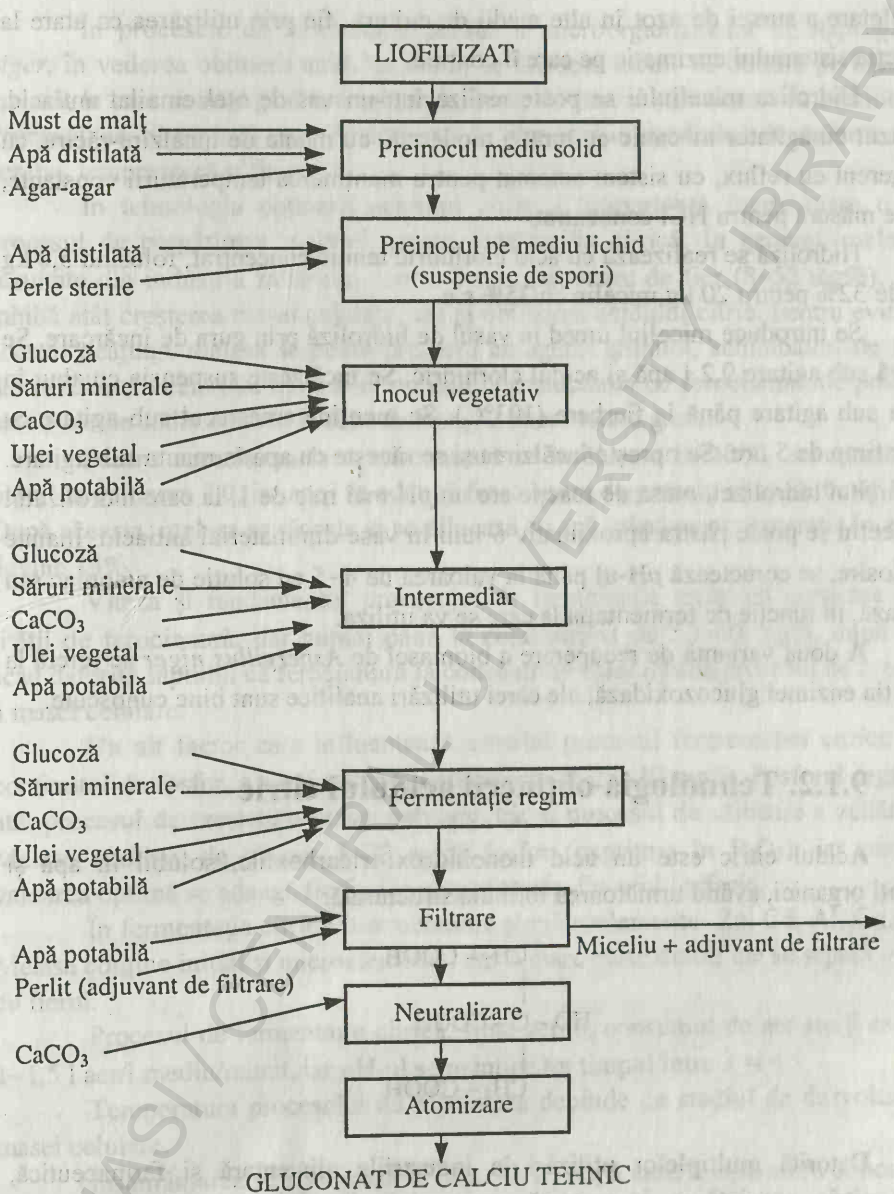


Fig. 9.3. Schema operaţiilor principale şi a fluxurilor de materiale în procesul de obţinere a gluconatului de calciu tehnic.

Recuperări şi deşeuri. Din procesul de obţinere a gluconatului de calciu tehnic prin biosinteză rezultă, la faza de filtrare a mediului de cultură, un miceliu de *Aspergillus niger*, cu aproximativ 40% substanţă uscată; acesta poate fi recuperat fie prin transformarea sa în hidrolizat de miceliu şi folosit ca o

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

completare a sursei de azot în alte medii de cultură, fie prin utilizarea ca atare la extracția sistemului enzimatic pe care îl conține.

Hidroliza miceliului se poate realiza într-un vas de oțel emailat antiacid, prevăzut cu agitator mecanic cu turația moderată, cu manta de încălzire-răcire, cu refrigerent cu reflux, cu sistem automat pentru menținerea temperaturii constante, vas de măsură pentru HCl concentrat.

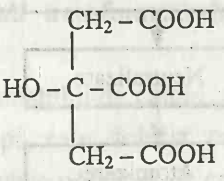
Hidroliza se realizează cu acid clorhidric tehnic concentrat, folosind 5,0 kg HCl de 32% pentru 20 kg miceliu cu 35% s.u.

Se introduce miceliul umed în vasul de hidroliză prin gura de încărcare. Se adaugă sub agitare 9,2 l apă şi acidul clorhidric. Se încălzeşte suspensia cu abur în manta sub agitare până la fierbere (103°C). Se menține amestecul sub agitare cu reflux timp de 5 ore. Se opreşte încălzirea şi se răceşte cu apă în manta sub agitare. La sfârşitul hidrolizei, masa de reacție are un *p*H mai mic de 1, la care hidrolizatul de miceliu se poate păstra aproximativ 6 luni în vase din material antiacid. Înainte de folosire, se corectează *p*H-ul până la valoarea de 4–5 cu soluție de amoniac sau altă bază, în funcție de fermentația la care se va utiliza.

A doua variantă de recuperare a biomasei de *Aspergillus niger* se referă la extracția enzimei glucozoxidază, ale cărei utilizări analitice sunt bine cunoscute.

9.1.2. Tehnologia obținerii acidului citric

Acidul citric este un acid monohidroxi-tricarboxilic, solubil în apă şi solvenți organici, având următoarea formulă structurală:



Datorită multiplelor utilizări în industriile alimentară şi farmaceutică, acidul citric prezintă o importanță economică deosebită. Au fost cercetate tehnologii prin biosinteză cu *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus*, *Penicillium luteum*, *Penicillium citrinum*, dar aplicații industriale şi-au găsit numai tehnologiile ce folosesc culturi de *Aspergillus niger*, dintre mediile studiate (cu melasă, glucoză, zahăr), cel mai eficient s-a dovedit mediul de cultură pe bază de melasă.

În ceea ce priveşte mecanismul de biosinteză a acidului citric, prezența în biomasă a acizilor aconitic, succinic, malic şi fumaric demonstrează că acidul citric se formează ca rezultat al reacțiilor ciclului acizilor tricarboxilici.

În procesele de fermentație aerobă a microorganismelor de *Aspergillus niger*, în vederea obținerii acidului citric, se folosesc medii de cultură pe bază de melasă, la care se adaugă săruri minerale, surse de azot și stimulatori de biosinteză. Procesul de biosinteză este determinat de compoziția mediului de cultură, *p*H, aerație, temperatură și timp.

În tehnologia obținerii acidului citric, o importanță foarte mare o are procesul de pregătire a melasei pentru fermentația citrică. În general, melasele rezultate din industria zahărului conțin o cantitate mare de fier (8–52 mg%), care inhibă atât creșterea masei celulare, cât și obținerea acidului citric. Pentru evitarea acestui neajuns, melasa se poate prelucra cu agenți chimici, schimbători de ioni, dar rezultatele cele mai bune s-au obținut la prelucrarea cu ferocianură de potasiu, care permite sedimentarea ionilor de fier și a altor metale grele.

Pentru aceasta, melasa concentrată se încălzește la 40°C, se corectează *p*H-ul la valoarea 7,0, iar apoi se adaugă ferocianura de potasiu și se fierbe 45 min. După aceasta, melasa se răcește și se diluează cu apă, până ce concentrația în zahăr devine 15%.

Viteza și randamentul procesului de fermentație cresc cu creșterea cantității de ferocianură, dar numai până la concentrația de 50–60 mg%, după care scad datorită faptului că ferocianura la concentrații mari inhibă procesul de creștere a masei celulare.

Un alt factor care influențează sensibil procesul fermentației citrice este conținutul de fosfor, a cărui valoare optimă este de 25–30 mg%. Fosforul reglează atât procesul de creștere a masei celulare, cât și procesul de utilizare a zahărului. Melasa conține, de obicei, 3–20 mg% fosfor (exprimat în P_2O_5), iar până la valoarea optimă se adaugă fie fosfor monopotasic, fie acid fosforic.

În fermentația citrică sunt necesare și microelemente: Zn, Cd, Al, Cu, Mg. Melasa conține inițial și microelemente, dar o mare parte dintre ele se separă o dată cu fierul.

Procesul de fermentație citrică, fiind aerob, consumul de aer steril este de 1–1,5 l aer/l mediu/minut, iar *p*H-ul se menține tot timpul între 3 și 4,5.

Temperatura procesului de biosinteză depinde de stadiul de dezvoltare al masei celulare.

Însămânțarea se realizează la 36...42°C, după care temperatura coboară la 34...36°C și se menține la această valoare timp de 24–36 ore, cât durează dezvoltarea masei microbiene, apoi temperatura se scade la 30...32°C și se menține la această valoare pe toată durata elaborării acidului citric.

Studiind dinamica procesului de biosinteză a acidului citric, rezultă că acumularea sa începe după 25–30 ore de fermentație, iar viteza maximă de acumulare se atinge în zilele a 5-a și a 6-a. Din cantitatea totală de sursă de carbon, 10–15% se folosește pentru dezvoltarea biomasei. În final, se obține un amestec de acizi organici, în care acidul citric reprezintă 80–95%.

Din punct de vedere tehnologic, procesul de fermentație a acidului citric cu *Aspergillus niger* poate fi realizat la suprafață sau în profunzime.

În primul sistem fermentația durează 10–11 zile, iar în al doilea 6–7 zile.

După terminarea fazei de fermentație și filtrarea miceliului, soluția apoasă se supune prelucrării pentru separarea acidului citric cristalin.

Separarea acidului citric sub formă de cristale se bazează pe proprietatea unor săruri ale sale (sare de calciu) de a nu se dizolva în apă și se realizează în următoarele etape:

– precipitarea acidului citric sub formă de sare de calciu și filtrarea acestuia;
– tratarea cu acid sulfuric și separarea sulfatului de calciu precipitat;
– decolorarea cu cărbune activ, demineralizarea și concentrarea soluției de acid citric;
– cristalizarea și filtrarea;
– uscarea (în strat fluidizat).

Din procesul de obținere a acidului citric rezultă soluții apoase (conținând zahăr, aminoacizi, acizi carboxilici) și miceliu. Soluțiile apoase pot fi utilizate ca medii de cultură pentru biostimulatori, iar miceliul uscat poate fi utilizat ca adaos în hrana păsărilor, având un efect stimulator în procesul de creștere.

9.2. BIOSINTEZA AMINOACIZILOR

Pentru menținerea funcțiilor metabolice în organism și formarea proteinelor, aminoacizii esențiali trebuie introduși continuu în organism prin intermediul alimentelor. Alimentele nu au aceeași valoare biologică din punct de vedere al conținutului în aminoacizi esențiali.

În general, produsele din regnul animal (ouă, lapte, carne, pește) au o valoare biologică mai mare decât cele din regnul vegetal (cereale, legume) care conțin o proporție mai mică de aminoacizi esențiali. În special, cerealele se remarcă prin lipsă de lizină și exces de leucină.

Deoarece producția animală este mai scăzută decât cea agricolă, în unele regiuni ale lumii se observă o stare de subnutriție continuă a populației. Remedierea acestei situații se poate face fie direct prin folosirea în alimentația omului a unui amestec de proteine naturale (cereale cu lapte etc.) sau prin administrarea unuia sau mai multor aminoacizi esențiali, fie indirect prin completarea valorii nutritive a nutrețurilor vitelor, păsărilor și porcilor. În acest ultim caz se obține o creștere apreciabilă a producției de animale, dacă nutrețurile sunt suplimentate cu adaosuri proteice de diferite proveniențe bogate în lizină ca: făina de pește, drojdia furajeră etc., precum și cu preparate de aminoacizi esențiali.

Adaosul de lizină şi metionină în nutreţuri ridică valoarea nutritivă a furajelor la nivelul proteinelor animale.

Având în vedere cererea masivă în acest aminoacid, pe plan mondial s-a dezvoltat industria fermentativă care produce prin biosinteză lizina.

9.2.1. Biosinteza L-lizinei

9.2.1.1. Microorganisme producătoare de L-lizină

În 1956, în laboratorul din Kinoshita a fost izolat un microorganism capabil să producă glutamat într-un mediu care conţinea glucoză şi ioni de amoniu. Acest microorganism, denumit *Micrococcus glutamicus*, prezintă **caracteristici comune** genurilor *Corynebacterium* şi *Brevibacterium*. Bacteriile se prezintă sub formă de bacili scurţi sau cocoidali Gram-pozitivi, nesporulate, imobile, aerobe. Necesită biotină ca factor esenţial de creştere. Forma celulelor este adesea variabilă, în funcţie de compoziţia mediului de cultură. Unul din factorii principali, care afectează forma celulelor, este concentraţia de biotină din mediu. Pe medii solidificate se prezintă sub formă de colonii plate cu contur regulat, de culoare galben-citron. Conţinutul molar în *G+C* este de 53–55%. Temperatura optimă de dezvoltare este de 32°C.

Prin aceste caractere, *Micrococcus glutamicus* se încadrează în genul *Corynebacterium*, astfel încât denumirea admisă în prezent este de *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*).

În mai puţin de un deceniu s-au descoperit şi alte microorganisme producătoare de acid glutamic. Pentru clasificarea şi identificarea acestor microorganisme, chemotaxonomia este un important instrument.

Keddie şi colaboratorii (1978, 1980) au clasificat bacteriile corineforme în 13 grupe şi a definit genul *Corynebacterium* ca fiind format din bacterii care conţin în peretele celular acid meso-diaminopimelic, arabinoză, galactoză, acid micolic şi menaquinone majore MK – 8 ori MK – 9 şi 51–59 % *G* + *C* în ADN.

Această definiţie este aproape comparabilă cu taxonul propus de Yamada şi Komagata pentru bacteriile ce aparţin grupului 1 al bacteriilor corineforme.

Aproape toate bacteriile producătoare de acid glutamic pot fi grupate în taxonul *Corynebacterium* propus de Keddie şi colaboratorii.

Komatsu şi Kaneko (1980) au raportat omologia ADN la unele bacterii producătoare de acid glutamic. Alte studii au demonstrat că *C. glutamicum* ATCC 13032, *C. lilium* ATCC 15990, *Brevibacterium flavum* (*B. flavum*) ATCC 14067 şi *B. divaricatum* ATCC 14020 pot fi grupate în acelaşi cluster de omologie a ADN-ului,

care este diferit de cel al lui *B. ammoniagenes* ATCC 6872, *Microbacterium flavum* şi *C. diphteriae* ATCC 11913.

Coroborând studiile de taxonomie polifazică, taxonomie convenţională, chemotaxonomie şi omologie a ADN-ului, se poate concluziona că bacteriile producătoare de acid glutamic reprezintă o singură specie ce aparţine genului *Corynebacterium*.

Tulpinile de tip sălbatic, producătoare de acid glutamic, au fost izolate din natură după capacitatea de a produce acid glutamic şi apoi prin inducere cu factori mutageni s-a obţinut o serie întreagă de mutante producătoare de diverşi aminoacizi, printre care şi L-lizina.

Tulpina folosită pentru obţinerea de mutante producătoare de L-lizină poate aparţine următoarelor genuri: *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacterium* etc.

Mutantele care au un nivel ridicat de biosinteză a L-lizinei aparţin următoarelor **clase**:

– mutante auxotrofe, dependente de homoserină sau metionină + treonină, metionină + homocisteină, treonină + cistationină sau treonină;

– mutante duble care, în afara auxotrofiei indicate mai sus, sunt auxotrofe în plus faţă de leucină, histidină sau izoleucină + valină;

– mutante reglatoare, rezistente la analogi ai lizinei (S-2-aminoetilcisteină), ai treoninei, acidul α-amino-β-hidroxivalerianic sau izoleucina, acidul α-aminobutiric etc.;

– mutante „leaky", la care activitatea genei mutante nu este complet alterată, putând fi exprimată fenotipic parţial;

– mutante auxotrofe şi rezistente la antibiotice.

Pentru biosinteza lizinei se folosesc şi alte organisme precum: *Arthrobacter citrus*, *Trichospora cutaneum*, *Hycobacterium tuberculosis* ATCC 15073, *Streptomyces coronoformis* ATCC 15074.

9.2.1.2. Mutantele şi recombinarea genetică la bacteriile corineforme

Mutante biochimice. Succesul în producţia industrială a acidului glutamic a stimulat interesul pentru descoperirea mutantelor producătoare de alţi aminoacizi.

Tulpinile de tip sălbatic producătoare de acid glutamic sunt capabile să sintetizeze numai câţiva aminoacizi, precum acidul glutamic, valină, prolină, glutamine şi alanine.

Pentru producerea extracelulară a unui aminoacid dorit sunt necesare modificări ale metabolismului celular şi ale mecanismului de control al acestuia. Astfel, s-au făcut încercări pentru a obţine mutante auxotrofe şi mutante reglatoare.

Avantajul folosirii mutantelor auxotrofe constă în acela că ele elimină ramificația căilor metabolice care nu prezintă interes, favorizând în acest mod acumularea în mediu numai a unui aminoacid.

Mutantele reglatoare sunt mutante care şi-au pierdut o anumită cale de reglare biochimică. Ele sunt de două categorii:

– rezistente la un analog al aminoacidului respectiv;

– revertante ale mutantelor auxotrofe, care sunt deficiente pentru o anumită enzimă reglatoare.

Cei mai mulți aminoacizi sunt produşi astăzi folosind mutante care conțin combinații ale mutațiilor auxotrofe şi reglatorii.

Tulpinile înalt producătoare au fost obținute prin eliminarea abilității organismului de a degrada produsul final şi prin îmbunătățirea permeabilității celulei în favoarea excreției produsului.

Inițial, s-au obținut mutante producătoare de L-lizină folosind ca tulpini parentale microorganismele producătoarele de acid glutamic şi ca factor mutagen radiațiile UV, X şi γ.

Mutantele obținute cu ajutorul radiațiilor UV. Acțiunea primară a radiațiilor UV se exercită asupra bazelor azotate pirimidinice (adenină şi timină), având drept efecte hidratarea bazelor azotate şi formarea dimerilor pirimidinici.

În lucrările de mutageneză din țara noastră cu tulpina *B. lactofermentum* ATCC 13869, radiațiile UV au indus, însă, un procent scăzut de mutante auxotrofe şi anume **0,38%** [Săsărman E., 1971].

Doza inductoare de mutante auxotrofe producătoare de L-lizină a fost pentru *B. lactofermentum* ATCC 13869 de 48×10^3 ergi/cm^2, care a indus o letalitate de 99,9%.

Rezultatele obținute confirmă datele din literatură care susțin că pentru obținerea de mutante se folosesc dozele cele mai mari care au ca efect letalități exponențiale, înainte de a se instala rezistența microorganismelor față de radiațiile UV.

Mutantele obținute cu ajutorul radiațiilor gama. La tulpina *C. melassecola* ATCC 17965, radiațiile gama au indus mutante auxotrofe cu o frecvență foarte apropiată de cea a radiațiilor UV şi anume **0,4%**. Dozele inductoare au fost de 20–25 kr. Aceste doze provoacă letalități care se găsesc pe curba exponențială, imediat după faza inițială de *lag* şi care corespund unor letalități de 70–80% [Săsărman E., 1975].

Recent, mutageni chimici precum **N – metil – N' – nitro – N – nitrozo – guanidină (NTG)** au fost utilizați în locul mutagenilor fizici de mai sus, datorită frecvențelor mai înalte ale mutațiilor şi tratamentelor mai simple.

NTG este un agent alchilant care produce alchilarea bazelor azotate din acizii nucleici: N_7 – guanina, N_1 – şi N_3 – adenina, N_1 – citozina şi N_1 – timina.

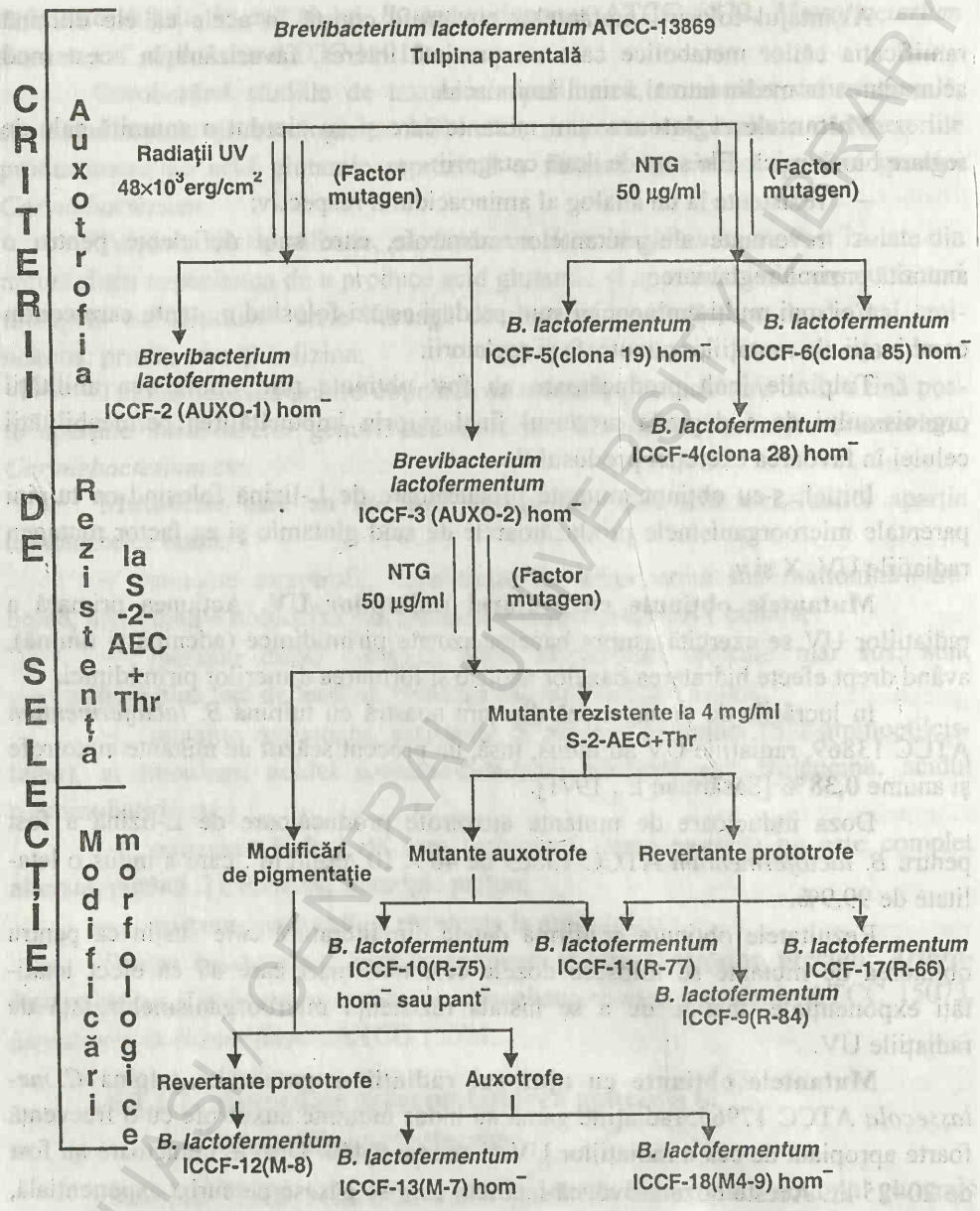


Fig. 9.4. Genealogia mutantelor din genul *Brevibacterium* producătoare de L-lizină. (După Săsărman E.,1979.)

La *B. lactofermentum* ATCC 13869, la o concentrație de 50 µg/ml și 2 h de expunere, s-a obținut un procent maxim de **34,9%** mutante auxotrofe. Concentrația eficace s-a dovedit aceea care se înscrie pe prima parte a curbei exponențiale, ceea

BUCUREȘTI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

ce corespunde unei letalități de **44,9%** pentru *B. lactofermentum* ATCC 13869 și **85,8%** pentru *B. lactofermentum* ICCF-3. Analiza dozelor mutagene eficace la tulpinile parentale studiate sugerează ideea că pentru obținerea de mutante auxotrofe producătoare de L-lizină sunt necesare doze relativ mici. Aceasta s-ar putea explica prin faptul că mutația este punctiformă, afectează o singură genă sau un grup restrâns de gene structurale și reglatoare implicate în biosinteza L-lizinei.

Din totalitatea mutantelor izolate, numai mutantele dependente de homoserină, iar dintre acestea numai o parte, au acumulat cantități apreciabile de L-lizină. Această caracteristică s-ar datora selectivității mediului de fermentație pe care s-a realizat biosinteza. De aici rezultă că ultima treaptă de selecție este determinată de componenta chimică a mediului de fermentație folosit (fig. 9.4).

Recombinarea genetică la bacteriile corineforme. Fagii temperați și transducția. Cele mai cunoscute metode de recombinare genetică la bacterii sunt: fuziunea celulară mediată de factorul F, transducția fagică și transformarea ADN-ului. Se cunosc numai câteva cazuri de aplicare a acestor metode în scopuri industriale.

Recent, s-a raportat obținerea unor tulpini de *Serratia marcescens* producătoare de arginină, histidină, izoleucină ori treonină cu ajutorului fagului temperat PS-20, care a fost utilizat pentru transducția câtorva caractere legate de necesitățile nutriționale și reglarea metabolică.

Într-un studiu asupra bacteriilor producătoare de acid glutamic aparținând genurilor *Corynebacterium* ori *Brevibacterium*, nu s-a obținut transducția caracterelor auxotrofe cu ajutorul fagilor temperați. În alte studii, fagul temperat CP-119 a fost capabil să transducă caractere auxotrofe la *Brevibacterium sp.* cu o frecvență de 10^{-7}.

Recent, au fost izolate 4 tipuri de fagi temperați de la *C. glutamicum*. Fiecare fag avea un cap poliedric și o coadă cu o teacă contractilă. Ei au fost clasificați în 2 grupe moleculare: $10–11 \times 10^6$ Da și $25–26 \times 10^6$ Da.

Se investighează încă utilizarea acestor fagi în transducție.

Fuziunea celulară. Fuziunea celulară a devenit o metodă promițătoare pentru obținerea producătorilor de aminoacizi. Metoda depinde, în principal, de tratarea celulelor cu lizozim în condiții izotonice, după cultivarea lor în prezența unor concentrații scăzute de penicilină. În acest mod se obțin protoplaști. În ceea ce privește efectele stării fiziologice a celulelor asupra caracteristicilor protoplaștilor, sunt cunoscute puține date. Baltz a raportat existența unei etape de „tranziție" critică între creșterea exponențială și cea staționară pentru prepararea protoplaștilor la bacteriile Gram-pozitive (*Streptomyces fradiae* și *S. griseofuscus*), care ar putea fi răspunzătoare de o bună regenerare a protoplaștilor. S-a observat că protoplaștii obținuți din micelii foarte vechi au o viabilitate mai redusă.

Există mai multe posibilități de a se induce fuziunea într-o populație microbiană de protoplaști.

Primele cercetări se referă la fuziunea microbiană în prezența virusurilor inactivate. Sistemul cel mai eficient și frecvent aplicat constă în folosirea *polietilenglicolului* (*PEG*) cu greutate moleculară ridicată și în prezența ionilor de calciu.

Acest excelent agent de deshidratare folosit pentru prima dată în studiile referitoare la protoplaștii bacterieni ca stabilizator a fost introdus mai târziu ca agent de fuziune. PEG-ul a fost larg folosit ca precipitant pentru o mare varietate de macrostructuri incluzând bacterii, virusuri, proteine, ADN. Probabil că PEG-ul induce precipitarea prin modificarea structurii apei, excluzându-se posibilitatea hidratării stratului din jurul particulelor sau moleculelor. Se recomandă fie concentrații mici de PEG cu greutate moleculară mare (PEG 6000 sol. 1%), fie concentrații mari la greutăți moleculare mici (50–60% PEG 1000). În general, recomandările bibliografice se referă la folosirea de PEG cu greutate mică pentru procariote. În practică, însă, se folosește PEG 6000–8000 pentru procariote.

PEG-ul purificat nu prezintă caracteristici fuzogene, de aceea activitatea fuzogenă este asociată cu o substanță care impurifică PEG-ul, probabil un antioxidant. Adăugarea unor antioxidanți la PEG-ul purificat restaurează parțial sau complet activitatea fuzogenă. Deși complexul de fuziune PEG Ca^{2+} are o serie de avantaje sub raportul eficienței ridicate și a accesibilității, metoda prezintă următoarele *dezavantaje*:

– condiții fiziologice necorespunzătoare ca: valori de *p*H extreme (prea ridicate sau prea scăzute) și concentrație ridicată de calciu care afectează viabilitatea celulelor fuzionate;

– imposibilitatea observării microscopice a recombinanților doriți în scopul izolării lor;

– fuziune asincronă cu formare de agregate heterogene cu număr variabil de protoplaști;

– acțiunea necontrolată a agenților fuzogeni chimici asupra membranei celulare, afectând viabilitatea celulară;

– frecvența scăzută a recombinanților.

Realizări deosebite s-au obținut în domeniul hidratării celulare prin *metoda electrofuziunii*.

Prin această metodă, celulele sunt supuse unui impuls electric de durată scurtă și intensitate ridicată. Curentul induce o rupere reversibilă în zona de contact membrană-membrană, conducând la fuziune celulară. Ca urmare, crește permeabilitatea celulară, permițând transferul de material genetic și citoplasmatic.

În general, fuziunea se realizează în condițiile de *p*H și temperatură specifice fiecărei tulpini în scopul menținerii protoplaștilor în mediul hipertonic.

S-a constatat că adaosul de EDTA și K_2HPO_4 stimulează fuziunea, obținându-se în condiții optime o frecvență de fuziune de 5×10^{-6}.

În procesul de fuziune, ambii parentali participă atât prin componentele citoplasmatice, cât și prin cele cromozomale. În condiții fiziologice determinate, participarea celor 2 genitori la formarea recombinanților variază în limite foarte mari. Astfel, după studiile efectuate pe model experimental *Bacillus subtilis*, se pot obține recombinanți cu participare egală a celor doi genitori.

Tehnica fuziunii de protoplaști deschide noi perspective teoretice de studiu, dar, mai ales, noi căi de abordare practică prin obținerea de recombinanți utili pentru biosinteză.

Fuziunea de protoplaști se referă la existența a două microorganisme caracterizate genetic și care pot fi urmărite sub raportul contribuției lor la formarea „hibridului" prin așa-numiții „markeri genetici".

De exemplu, protoplaștii de la două tulpini de *C. glutamicum* care aveau caractere auxotrofe diferite și erau rezistente la streptomicină ori rifampicină au fuzionat, obținându-se linii recombinante cu o frecvență de 10^{-6}–10^{-7} per protoplaști folosiți, care erau rezistenți la ambele antibiotice.

Caracterele auxotrofe ale unora dintre fuzanți erau diferite de cele ale liniilor parentale, ceea ce dovedește că aceștia erau recombinanți.

Una din tulpinile folosite – KY 9182 – era rezistentă la streptomicină și necesita fenilalanină, iar altă tulpină – KY 9684 – era rezistentă la rifampicină și necesita homoserină și leucină. Tulpinile cu rezistență dublă la streptomicină și rifampicină erau recombinante.

Metoda fuziunii protoplaștilor permite obținerea a numeroși recombinanți, utili pentru producerea aminoacizilor.

Manipularea genetică. Recent, tehnologia ADN recombinant a fost folosită, pe scară largă, pentru producerea unor polipeptide valoroase din punct de vedere medical.

O serie de gene au fost clonate și exprimate în *E. coli* cu ajutorul vectorilor plasmidiali.

Se speră ca asemenea experimente de manipulare genetică să fie aplicate și pentru îmbunătățirea producerii de aminoacizi.

Debabov și colaboratorii (1982) și Miwa și colaboratorii (1981) au raportat obținerea unei tulpini bacteriene cu producție semnificativ crescută de treonină; un operon al treoninei a fost introdus în *E. coli* K-12 prin transformare cu o plasmidă

hibridă construită din pBR 322. În condiții optime, treonina a fost sintetizată într-o cantitate mai mare decât în tulpinile parentale.

Tehnologia ADN recombinant este utilă şi pentru ameliorarea tulpinilor producătoare de lizină.

Deşi operonul triptofanului este primul la care s-a deschis mecanismul de reglaj al exprimării genice prin *atenuare transcripțională*, s-a constatat că şi operonii implicați în biosinteza altor aminoacizi, printre care şi lizina, manifestă acest fenomen. Astfel, în cazul operonului triptofanului, când în celulă există suficient triptofan, ribozomii traduc regiunea inițială a ARN*m* transcris din prima genă a operonului *Trp* (această zonă este bogată în codoni UGG ce codifică triptofan). Ca urmare, ribozomii se deplasează în această regiune a ARN*m* cu viteze diferite, funcție de concentrația triptofanului (*Trp*) în citoplasmă.

Ca urmare a vitezei de deplasare a ribozomilor, ARN*m* din această zonă poate lua două conformații sterice, dintre care una generează o structură „hair-pin", denumită atenuator şi care funcționează ca un terminator *rho* – independent, blocând avansarea ARN polimerazei. Este oprit astfel procesul de transcriere (transcriere abortivă) a întregului operon.

Eforturi recente au făcut posibilă izolarea câtorva plasmide de la bacteriile corineforme.

Au fost construite plasmide recombinante ce pot fi folosite ca *vectori shuttle* între *E. coli* şi bacterii corineforme. Un asemenea exemplu este plasmida *p*NAR$_4$, care a fost construită pornind de la plasmide *p*NAT 65 (de la corineforme) şi plasmida *p*ACY 177 (de la *E. coli*). În urma unor experiențe de transformare a unor tulpini de corineforme, s-a constatat că plasmida „shuttle" induce instabilitate genetică: de structură şi/sau de segregare. Este posibil ca aceste fenomene de instabilitate plasmidială să fie determinate de procese de recombinare inter- şi/sau intramoleculară, care să implice două molecule plasmidiale şi/sau o moleculă plasmidială şi un cromozom.

Au fost construite *plasmide capabile să inducă mutații* la bacteriile corineforme. Aceste plasmide conțineau un element transportabil, izolat de la o bacterie corineformă şi un marker genetic (rezistența la un antibiotic).

De altfel, au fost realizate o serie de experimente de mutageneză situs specifică la tulpini din genurile *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* şi *Rhodococcus* utilizând gena *sac B* izolată de la *Bacillus subtilis* ca marker pozitiv de selecție, pentru *izolarea elementelor de inserție*.

Alte experiențe au urmărit *clonarea şi exprimarea diferitelor gene din calea de biosinteză a L-lizinei* de la *C. glutamicum*.

S-a demonstrat că o creştere a fluxului L-aspartat semialdehidei spre L-lizină poate fi obţinută la tulpini cu o activitate crescută a dihidrodipicolinat sintazei. Prin combinarea superexpresiei dihidrodipicolinat sintazei şi aspartokinazei poate creşte secreţia L-lizinei (10–20%). În plus, faţă de factorii consideraţi până în prezent a fi importanţi pentru superproducţia aminoacidului, trebuie să fie luată în considerare şi excreţia acestuia în mediul de cultură.

Recent, s-a demonstrat că L-glutamatul, L-lizina şi L-izoleucina nu sunt secretate prin difuzie pasivă, ci prin sisteme de transport active.

Studiul tulpinii *C. glutamicum* superproducătoare de lizină a indicat că acest transport are o puternică influenţă asupra superproducţiei acestui aminoacid. Pentru construirea unor tulpini înalt producătoare de lizină, utilizând tehnicile de clonare genică, este necesară şi *superexpresia genelor implicate în sistemele de transport.*

Deşi tehnologia ADN recombinant este utilă pentru ameliorarea genetică a bacteriilor, numeroase probleme împiedică progresul rapid în acest domeniu. Acestea includ informaţiile limitate privind genetica moleculară a bacteriilor, diversitatea tulpinilor producătoare utilizate şi complexitatea căilor de biosinteză ale aminoacizilor.

9.2.1.3. Obţinerea L-lizinei prin biosinteză

Metode de obţinere. L-lizina poate fi obţinută prin trei metode: extracţie din produse naturale, sinteză chimică, biosinteză.

Extracţia din produse naturale (caseina, gelatina, glutenul de grâu sau soia). Pe această cale se obţin produse optic-active (L). Însă, cantitatea mare de materii prime necesare, producţia redusă şi preţul de cost ridicat au impus elaborarea altor metode mai economice.

Sinteza chimică. Cea mai rentabilă este metoda care pleacă de la caprolactamă. Pe lângă complexitate şi preţ ridicat, metoda prezintă dezavantajul obţinerii de preparate racemice, care trebuie separate apoi în cei doi antipozi optici.

Biosinteza. Metoda microbiologică are avantajul folosirii unor materii prime ieftine, dar producţia respectivă necesită timp şi aminoacizii formaţi trebuie separaţi de alţi aminoacizi din mediu şi de diferite impurităţi, inclusiv celulele microbiene.

Primul procedeu de obţinere a L-lizinei, *sinteza în două etape*, a fost elaborat de firma Pfizer în 1956.

Conform acestuia, L-lizina se obţine în două etape: biosinteza acidului diaminopimelic (DAP) urmată de decarboxilarea enzimatică a acidului diaminopimelic cu formarea L-lizinei.

Prin acest procedeu, în prima fază se cultivă, pe un mediu cu extract de porumb şi adaos de săruri minerale, o mutantă lizinodependentă de *E. coli* capabilă

să sintetizeze acid diaminopimelic. Separat se cultivă o tulpină de *E. coli* sau *Aerobacter aerogenes* producătoare de DAP-decarboxilază (enzimă ce produce decarboxilarea DAP la lizină). Suspensia celulară de *A. aerogenes* obținută este apoi supusă acțiunii agenților chimici (butanol, toluen) sau fizici (ultrasunete) pentru eliberarea enzimei.

În faza a doua se amestecă cele două soluții nutritive și se continuă fermentația, timp în care are loc decarboxilarea acidului diaminopimelic cu formarea L-lizinei.

Sinteza în două etape a fost abandonată; în prezent, metoda cea mai folosită este *sinteza directă.* Aceasta a fost realizată de Kinoshita și colaboratorii săi în 1958. Folosind ca agenți mutageni radiații UV sau radiații γ, Kinoshita a obținut o serie de mutante biochimice din tulpina de *C. glutamicum*, toate fiind mutante auxotrofe dependente de diferiți aminoacizi. Printre aceste mutante, patru prezentau interes mai mare:

- mutantă auxotrofă dependentă de homoserină și biotină (Hom^-, Bio^-);
- mutantă auxotrofă dependentă de metionină (Met^-);
- mutantă auxotrofă dependentă de metionină și leucină (Met^-, Leu^-);
- mutantă auxotrofă dependentă de izoleucină (Ile^-).

Dintre acestea, cea care dă rezultatele cele mai bune, sub raportul acumulării de lizină în cantitate mare, este mutanta auxotrofă dependentă de homoserină și biotină, care a fost introdusă în practica industrială.

Procedeul de biosinteză a lizinei într-o singură etapă a fost transpus la scară industrială în 1960. Conform procedeului elaborat de firma Kyowa Hakko Kogyo, se cultivă o mutantă de *C. glutamicum* pe un mediu ce conține o sursă de carbon, surse de azot, săruri minerale și aminoacizi (homoserină, metionină, treonină), obținând direct L-lizină.

Fermentația se efectuează în condiții aerobe, la temperaturi cuprinse între 24 și 37°C, la un *p*H cuprins între 5 și 8,5.

Durata fermentației este de 4–5 zile și asigură acumularea în mediu a unei cantități de L-lizină de 20–25 g/l. Din mediul fermentat rezultat de la biosinteză se poate separa L-lizină în stare pură prin adsorbție pe cationiți puternici, eluție cu baza slabă, concentrarea eluatului și cristalizarea produsului pur.

Pentru produsul destinat uzului veterinar, biomasa rezultată de la fermentație se prelucrează prin atomizare, obținându-se în final un amestec de L-lizină și masă bacteriană, amestec ce conține minimum 10% L-lizină și constituie un valoros biostimulator.

Mecanismul de biosinteză a L-lizinei. Substanța cheie de la care se pornește biosinteza L-lizinei este *acidul aspartic.* Acidul aspartic poate fi sintetizat prin două reacții diferite, folosind ca substrat un produs al ciclului acizilor tricarboxilici (TCA).

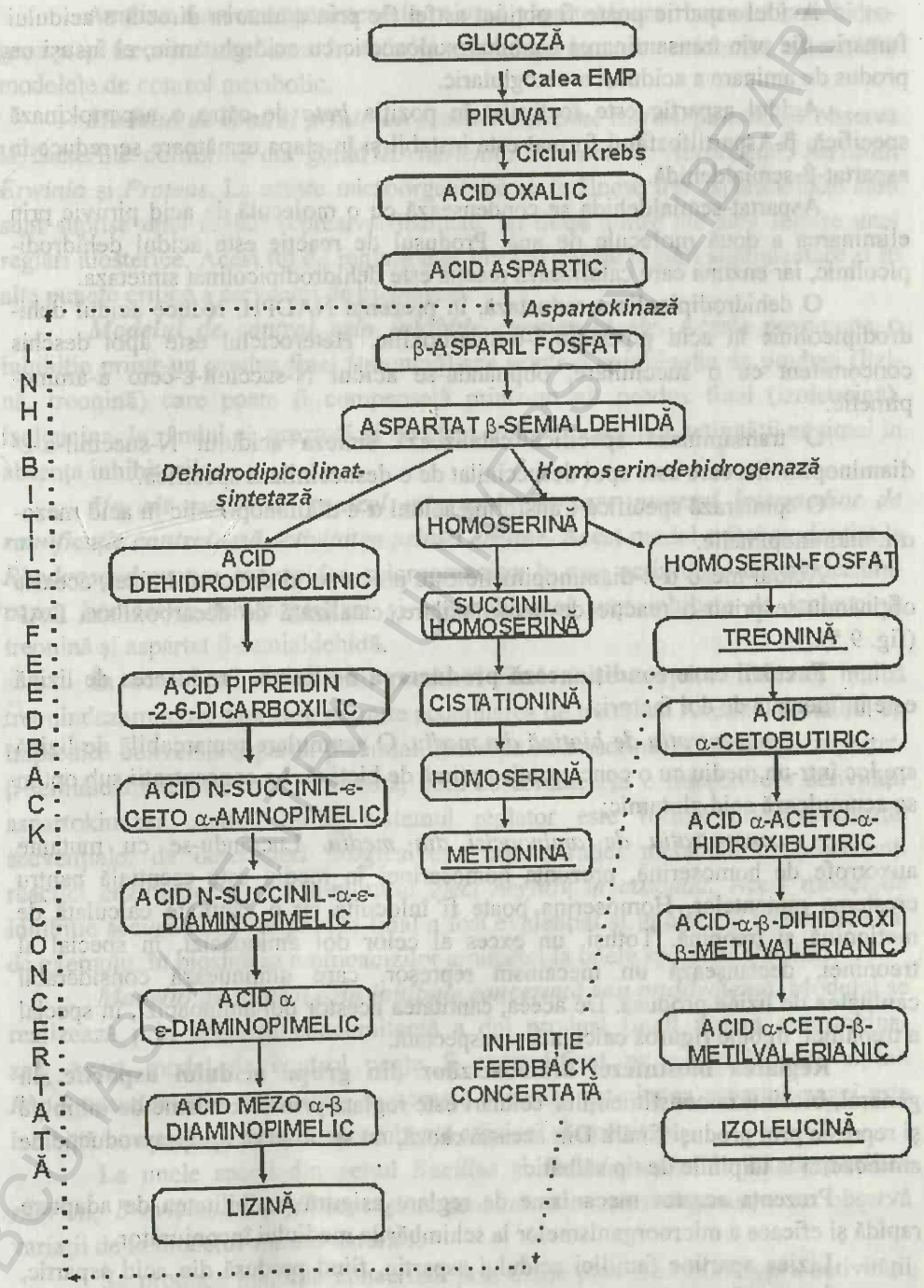


Fig. 9.5. Reglarea biosintezei lizinei la *Corynebacterium glutamicum* şi *Brevibacterium sp.* Reacții implicate în biosinteza L-lizinei (Vallino J. J., Stephanopoulos G., 1993).

Acidul aspartic poate fi obținut astfel fie prin aminarea directă a acidului fumaric, fie prin transaminarea acidului oxaloacetic cu acid glutamic, el însuși un produs de aminare a acidului α-cetoglutaric.

Acidul aspartic este fosforilat în poziția *beta* de către o aspartokinază specifică. β-Aspartilfosfatul format este instabil și în etapa următoare se reduce în aspartat-β-semialdehidă.

Aspartat-semialdehida se condensează cu o moleculă de acid piruvic prin eliminarea a două molecule de apă. Produsul de reacție este acidul dehidrodipicolinic, iar enzima care catalizează reacția este dehidrodipicolinat sintetaza.

O dehidrodipicolinat reductază, în prezența NADPH, reduce acidul dehidrodipicolinic în acid piperidin-2-6-dicarboxilic. Heterociclul este apoi deschis concomitent cu o succinilare, obținându-se acidul N-succinil-ε-ceto α-aminopimelic.

O transaminază specifică catalizează sinteza acidului N-succinil-α-ε-diaminopimelic, care este apoi desuccinilat de o desuccinilază specifică.

O epimerază specifică transformă acidul α-ε-diaminopimelic în acid mezo-α-ε-diaminopimelic.

Acidul mezo α-ε-diaminopimelic este precursorul direct al lizinei, aceasta obținându-se printr-o reacție de decarboxilare, catalizată de decarboxilaza DAP (fig. 9.5).

Factorii care condiționează producerea de lizină. Producerea de lizină este influențată de doi factori:

– *concentrația de biotină din mediu.* O acumulare remarcabilă de lizină are loc într-un mediu cu o concentrație optimă de biotină. La concentrații sub optim se acumulează acid glutamic;

– *concentrația de aminoacizi din mediu.* Lucrându-se cu mutante auxotrofe de homoserină, prezența homoserinei în mediu este esențială pentru creșterea mutantelor. Homoserina poate fi înlocuită cu o cantitate calculată de metionină și treonină. Totuși, un exces al celor doi aminoacizi, în special al treoninei, declanșează un mecanism represor, care diminuează considerabil cantitatea de lizină produsă. De aceea, cantitatea acestor doi aminoacizi, în special a treoninei, trebuie riguros calculată și respectată.

Reglarea biosintezei aminoacizilor din grupa acidului aspartic. În general, biosinteza constituenților celulari este reglată prin mecanisme de inhibiție și represie prin produși finali. Din această cauză, nu se observă o supraproducție de aminoacizi la tulpinile de tip sălbatic.

Prezența acestor mecanisme de reglare asigură posibilitatea de adaptare rapidă și eficace a microorganismelor la schimbările mediului înconjurător.

Lizina aparține familiei acidului aspartic, fiind produsă din acid aspartic, pe o cale ramificată, împreună cu treonina, metionina și izoleucină. Calea de biosinteză este aceeași la toate bacteriile testate până în prezent, dar mecanismele de control metabolic diferă.

Analiza datelor experimentale privind aspartokinaza, homoserin dehidrogenaza şi treonindezaminaza în diferite microorganisme au evidenţiat câteva din modelele de control metabolic.

Modelul de control printr-un sistem de enzime izofuncţionale. Se observă la bacteriile coliforme din genul *Escherichia*, *Salmonella*, *Aerobacter*, *Serratia*, *Erwinia* şi *Proteus*. La aceste microorganisme se întâlnesc trei aspartokinaze care sunt supuse unei reglări represive distincte, iar două dintre ele sunt supuse unei reglări alosterice. Acest tip de reglare este intensificat de reglări suplimentare şi în alte puncte critice a secvenţei de biosinteză.

Modelul de control prin inhibiţie compensatorie. Acesta presupune o inhibiţie printr-un produs final (treonină) sau printr-o combinaţie de produşi (lizină, treonină) care poate fi compensată printr-un alt produs final (izoleucină). Isoleucina, la rândul ei, prezintă şi un efect stimulator asupra activităţii enzimei în absenţa inhibitorilor.

Un alt model de control este acela în care punctul intermediar de ramificaţie controlează activitatea primei enzime. Acest model a fost evidenţiat la *Rhodopseudomonas spheroides*, microorganism la care activităţile treonindezaminazei, homoserin-dehidrogenazei şi aspartokinazei sunt inhibate de izoleucină, treonină şi aspartat β-semialdehidă.

În acest caz, izoleucina, produsul final al secvenţei ramificate, inhibă treonindezaminaza, fapt care permite acumularea de treonină. Aceasta, la rândul ei, împiedică conversia aspartat-β-semialdehidei în homoserină; concentraţia aspartat-β-semialdehidei este astfel crescută, ceea ce conduce la o micşorare a activităţii aspartokinazei. Astfel, întreg sistemul reglator este format din evenimente secvenţiale, de descreşteri progresive a concentraţiei metaboliţilor precedenţi reacţiei enzimatice prin aşa-numitul *efect negativ în cascadă*. Acest model de inhibiţie secvenţială prin produs final a fost evidenţiat şi în alte căi metabolice ca, de exemplu, în biosinteza aminoacizilor aromatici la unele specii de *Bacillus*.

Modelul de control prin inhibiţie concertată sau multivalentă. Modelul se realizează prin acţiunea concomitentă a doi produşi finali asupra aspartokinazei. Acest model de control poate fi exemplificat pe aspartokinaza tulpinii *Rhodopseudomonas capsulata*. În această bacterie, activitatea aspartokinazei este inhibată numai de prezenţa concomitentă a lizinei şi treoninei.

La unele specii din genul *Bacillus* şi *Pseudomonas*, la *Rhodospirillum rubrum*, *Brevibacterium flavum* şi o serie de alte microorganisme se observă variaţii de la modelul amintit anterior.

Se produce inhibiţia concertată prin lizină plus treonină asupra activităţii aspartokinazei concomitent cu inhibiţia manifestată de fiecare din aceşti aminoacizi în parte. Acest model de inhibiţie se observă la majoritatea microorganismelor.

La *Rhodospirillum rubrum* şi *Brevibacterium flavum* acţiunea concertată a lizinei plus treonina poate fi reversată fie prin adaos de izoleucină, fie prin metionină sau valină.

Se cunoaşte că *L-izoleucina* şi *L-metionina* represează expresia operonului *hom thr B* (gena *hom* codificatoare de homoserin dehidrogenază formează o unitate transcripţională împreună cu gena *thr B* codificatoare de homoserinkinază) de la *C. glutamicum* printr-un mecanism încă necunoscut. În consecinţă, izoleucina determină o creştere considerabilă a acumulării L-lizinei.

Adăugarea exogenă a L-metioninei are drept rezultat expresia homoserin dehidrogenazei, cu o scădere concomitentă a concentraţiei de L-treonină.

Scăderea concentraţiei de treonină are drept consecinţă scăderea inhibiţiei alosterice a aspartokinazei, care în final determină o creştere a fluxului de L-lizină.

Represia homoserin dehidrogenazei dependentă de L-metionină a fost evidenţiată la *C. glutamicum* şi *C. glutamicum sub sp. flavum*, având drept consecinţă reducerea nivelului enzimei până la cel mult 20% în mediul sintetic.

La *Pseudomonas putida* şi *Pseudomonas fluorescens* se observă, în afară de inhibiţia aspartokinazei prin lizină plus treonină, şi inhibiţia prin metionină plus treonină.

Indiferent de micile modificări observate în cazul inhibiţiei concertate prin produs final, *acest model de control reprezintă un mod important de reglare a primei enzime din metabolismul ramificat al acidului aspartic.*

Concomitent cu controlul inhibitoriu al activităţii enzimei prin mai mulţi produşi finali şi sinteza unor enzime poate fi represată de prezenţa simultană a câtorva produşi finali.

La *C. glutamicum* şi la *Brevibacterium sp.* există numai *două puncte critice* în care biosinteza lizinei poate fi limitată:

– aspartokinaza, a cărei activitate poate fi inhibată printr-o inhibiţie „feed-back" concertată, în prezenţa simultană a unui exces de lizină şi treonină în mediu. Nici unul dintre aceşti doi aminoacizi nu poate exercita această inhibiţie separat, ci numai împreună;

– devierea la homoserină, prin homoserin-dehidrogenază.

S-au găsit trei modalităţi prin care aceste două blocări pot fi eliminate printr-o singură mutaţie.

Folosirea mutantelor auxotrofe de homoserină sau homoserin-dependente (Hom⁻). Aceste mutante au activitatea homoserin-dehidrogenazică anulată, astfel încât aspartat-β-semialdehida nu va mai fi deviată la homoserină şi, deci, va fi utilizată complet pentru producerea de lizină.

Folosirea mutantelor sensibile la treonină sau metionină. Aceste mutante au fost izolate ca revertanţi prototrofi de la o tulpină *Hom⁻*.

Ele posedă o activitate homoserin-dehidrogenazică scăzută, astfel încât aspartat-β-semialdehida va fi deviată la homoserină cu o rată redusă, aceasta fiind folosită în special pentru biosinteza lizinei.

În al doilea rând, aceste mutante sunt capabile să sintetizeze numai cantităţi minime de treonină internă, ele fiind sensibile la concentraţii mari de treonină. Ca urmare, datorită concentraţiei scăzute de treonină intracelulară, aspartokinaza nu poate fi inhibată în activitatea ei, chiar la concentraţii mari de lizină.

Folosirea mutantelor rezistente la un analog al lizinei: S-2-(aminoetil)-L-cisteină (AEC^r). În mod normal, multiplicarea tulpinii *Brevibacterium flavum* este inhibată de S-(2-aminoetil)-L-cisteină. Inhibiţia este intensificată în mod marcat de L-treonină şi reversată de L-lizină. Aceasta înseamnă că S-(2-aminoetil)-L-cisteină funcţionează ca fals inhibitor feedback al aspartokinazei, enzimă reglatoare cheie din calea comună de biosinteză a lizinei. De aceea, unele mutante rezistente la S-(2-aminoetil)-L-cisteină este de aşteptat să fie mutante reglatoare, adică să aibă aspartokinaza insensibilă la inhibiţia feedback concertată, exercitată de treonină şi lizină. Într-adevăr, printre mutantele rezistente la S-(2-aminoetil)-L-cisteină, s-au găsit buni producători de lizină (31–33 g/l) care pot creşte atât în prezenţa S-(2-aminoetil)-L-cisteină, cât şi a treoninei.

Aspartokinaza, la aceste mutante, este de aproximativ 150 de ori mai puţin sensibilă la inhibiţia feedback exercitată de lizină şi treonină, comparativ cu enzima din tulpina parentală.

În ceea ce priveşte homoserin-dehidrogenaza, la aceste mutante, activitatea acestei enzime este inhibată uşor printr-o inhibiţie feedback de prezenţa în mediu a unui mic exces de treonină, sau izoleucină.

De regulă, la *C. glutamicum* şi *Brevibacterium sp.* se întâlneşte o singură aspartokinază multivalent reglată.

Totuşi, se pare că la *B. lactofermentum* 2256 există cel puţin două izoenzime ale aspartokinazei, una fiind sensibilă numai la lizină, iar alta la lizină şi treonină.

Spre deosebire de *C. glutamicum* şi *Brevibacterium sp.*, la *E. coli* lizina inhibă nu numai aspartokinaza (prima enzimă a căii comune), ci şi dehidrodipicolinat-sintetaza (prima enzimă a ramurii specifice). Aceasta deosebeşte net pe *E. coli* de producătorii de lizină folosiţi în industrie, tulpini de *C. glutamicum*, la care dehidrodipicolinat-sintetaza este insensibilă la inhibiţia feedback exercitată de lizină. Pentru producerea de lizină cu *E. coli*, ar trebui eliminate un număr mai mare de situsuri reglatoare, ceea ce este destul de dificil. De aceea, se preferă *C. glutamicum* sau *Brevibacterium*, la care printr-o singură mutaţie se elimină cele două puncte critice, asigurându-se acumularea în mediu a unei mai cantităţi de lizină.

9.2.1.4. Biosinteza lizinei în bioreactoare de laborator

Studii efectuate în bioreactoare de laborator cu o tulpină de *C. glutamicum* ATCC 2153 au evidenţiat patru faze ale procesului.

Faza I este marcată de creştere echilibrată şi de acumulare scăzută sau absentă a produşilor intermediari (excepţie CO_2).

Durata fazei 1, ca şi concentraţia biomasei la sfârşitul acestei faze, este guvernată de stocul iniţial de treonină, care împreună cu lizina inhibă aspartokinaza, prevenind superproducţia de lizină

Faza a II-a a fermentaţiei începe cu epuizarea stocului de treonină, în mod clar printr-o pauză în respiraţie şi este marcată de rate înalte de producere a lizinei şi biomasei, respiraţie constantă şi un *RQ* (coeficient de respiraţie) ridicat, de aproximativ 1,17, care este un indicator al superproducţiei lizinei. Faza a II-a durează aproximativ 4–5 ore, dar poate fi prelungită cu ajutorul *RQ*, ce controlează adiţia treoninei, ori prin cultivarea unei tulpini AEC^r.

Creşterea biomasei în timpul acestei faze este probabil datorată ori rezervelor de treonină, ori creşterii constituenţilor celulari (incluzând totalul proteinelor).

Modificările morfologiei celulelor care acompaniază depleţia treoninei extracelulare sunt destul de complexe şi foarte importante în sinteza lizinei, dar nu au fost investigate .

Faza a III-a începe cu un platou al creşterii şi este marcată de rate înalte ale producerii lizinei şi de descreşterea respiraţiei şi a *RQ* .

Faza a IV-a reprezintă în esenţă faza letală, evidenţiată prin reducerea gradată a producerii lizinei, descreşterea concentraţiei biomasei şi redirecţionarea glucozei spre formarea produşilor intermediari, cum ar fi: piruvat, acetat, alanină, valină, ca şi mici cantităţi de metaboliţi neidentificaţi, redirecţionare care poate fi asociată cu pierderea activităţii complexului piruvat dehidrogenază ori a enzimelor implicate în ciclul TCA, cum ar fi α-cetoglutarat dehidrogenază.

Se pare că descreşterea sintezei lizinei în această fază este datorată reducerii activităţii enzimelor primare, cum ar fi: complexul fosfoenolpiruvat carboxilază, care nu poate fi reactivat prea mult timp datorită absenţei treoninei şi pierderii turnoverului proteinei.

Probele de biomasă ale fazei I, a III-a şi a IV-a nu erau semnificativ diferite în ceea ce priveşte compoziţia elementară.

Peste tot, randamentul molar al lizinei în cazul fermentaţiei controlate a fost de numai 15%, randamentul molar instantaneu al lizinei în fiecare fază a fost: faza I – 0%; faza a II-a – 30%; faza a III-a – 20%; faza a IV-a – 10%.

Deşi faza I poate fi eliminată prin folosirea unei tulpini AEC^r de *C. glutamicum*, utilizarea altor tulpini a înlăturat necesitatea studiului distribuţiei fluxului metabolic, asociat cu superproducţia lizinei.

Similar, tehnicile „feed-batch" (alimentare discontinuă) pot fi folosite pentru a înlătura faza a IV-a.

În consecință, numai fazele a II-a și a III-a prezintă interes pentru perspectivele bioingineriei în fermentația L-lizinei.

Cea mai dramatică transformare metabolică este observată la nivelul distribuției fluxului, între faza I și a II-a a fermentației. Această „perturbare" metabolică este indusă de o dereglare bruscă a sintezei lizinei care cauzează o redistribuție temporară a fluxului din metabolismul primar, de la biomasă spre sinteza lizinei.

În timpul etapelor timpurii din faza a II-a, este observată cea mai înaltă încărcătură metabolică, deoarece ratele producerii lizinei și biomasei sunt apropiate de maximele lor.

În faza a III-a, glucoza este dirijată spre trehaloză și produși intermediari ai piruvatului, iar fluxurile susținute de glicoliză și ciclul TCA sunt diminuate.

Tendințele generale ale reacțiilor individuale sunt rezumate în figura 9.6.

Deși fluxul suportat de calea pentozo-fosfat este semnificativ pe tot cuprinsul celor trei faze ale fermentației, tranziția de la faza I la faza a II-a este însoțită de o creștere a fluxului pentru a satisface necesitățile ridicate în NADPH, dar mai târziu scade datorită descreșterii ratei de creștere a biomasei.

Fracțiunea glucozei catalizată de fosfoenolpiruvat carboxilază este destul de semnificativă în cele patru fluxuri analizate; în timpul tranziției de la faza I la faza a II-a, fluxul este crescut.

Fluxul fosfoenolpiruvat carboxilazei revine la condițiile fazei I în faza a II-a, probabil datorită reducerii activității fosfoenolpiruvat carboxilazei (PPC).

Reacția PPC (*reacția 9*) este extrem de importantă, deoarece este singura reacție anaplerotică activă din metabolismul primar, când *C. glutamicum* este cultivat pe mediu minimal cu glucoză.

Distribuțiile fluxului demonstrează, de asemenea, că PPC fixează mari cantități de CO_2, care complică analizele cantitative ale metabolismului.

Fracția glucozei catabolizată prin ciclul TCA fluctuează în jurul mediei. De exemplu, în timpul fazei I, fluxul ciclului TCA este crescut, dar se reduce când începe superproducerea lizinei datorită devierii metaboliților spre sinteza lizinei în ramura fosfoenolpiruvatului și piruvatului. În etapele târzii ale fazei a II-a, fluxul ciclului TCA revine la nivelul ei inițial, dar apoi scade din nou în faza a III-a, datorită devierii glucozei spre produși intermediari.

Excesul de ATP generează reacția ATP = ADP; au loc fluctuații în trepte corelate cu fluxul ciclului TCA.

Sistemul fosfotransferazic PEP: glucoză

(1) GLC+PER=GLC6P+PYR

(2) GLC6P+0,5ATP=0,5TREHAL+0,5ADP

Calea Embden-Meyerhof-Parnas (ciclul glicolizei)

(3) GLP6P=FRU6P

(4) FRU6P+ATP=2GAP+ADP

(5) GAP+ADP+NAD=NADH+G3P+ATP

(6) G3P=PEP+H_2O

(7) PEP+ADP=ATP+PYR

(8) PYR+NADH=LAC+NADH

Reacția anaplerotică; PEP carboxilaza

(9) PEP+CO_2=OOA

Ciclul acizilor tricarboxilici

(10) PYR+COA+NAD=ACCOA+CO_2+ +NADH

(11) ACCOA+OAA+H_2O=ISOCIT+COA

(12) ISOCIT+NADP=AKG+NADPH+CO_2

(13) AKG+COA+NDA=SUCCOA+CO_2+ +NADH

(14) SUCCOA+ADP+SUC+COA+ATP

(15) SUC+H_2O+FAD=MAL+FADH

(16) MAL+NAD=OAA+NADH

Producerea ori consumul acetatului

(17) ACCOA+ADP+AC+COA+ATP

Producerea glutamatului, glutaminelor, alaninei și valinei

(18) NH3+AKG+NADPH=GLUT+H_2O+ +NADP

(19) GLUT+NH_3+ATP=GLUM+ADP

(20) PYR+GLUT=ALA+AKG

(21) 2PYR+NADPH+GLUT=VAL+CO_2+ +H_2O+NADP+AKG

Calea pentozo monofosfaților

(22) GLC6P+H_2O+2NADP=RIBU5P+CO_2+ +2NADPH

(23) RIBU5P=RIB5P

(24) RIBU5P=XYL5P

(25) XYL5P+RIB5P=SED7P+GAP

(26) SED7P+GAP=FRU6P+GAP

(27) XYL5P+E4P=FRU6P+E4P

Fosforilarea oxidativă P/O=2

(28) 2NADH+O_2+4ADP=2H_2O+4ATP+ +2NAD

(29) 2FADH+O_2+2ADP=2H_2O+2ATP +2FAD

Grupa acidului aspartic

(30) OAA+GLUT=ASP+AKG

(31) ASP+PYR+2NADPH+SUCCOA+ +GLU+ATP=SUC+AKG+CO_2+LYSI+ +2NADP

(32) LYSI=LYSE

Sinteza bimasei

(33) 0,021GLC6P+0,007FRU6P+0,09RIB5P+ +0,036E4P+0,013GAP+0,15G3P+ +0,052PEP+0,03PYR+0,332ACCOA+ +0,08ASP+0,033LYSI+0,446GLUT+ +0,025GLUM+0,054ALA+0,04VAL+ +0,052THR+0,015MET+0,43LEU+ +3,82ATP+0,476NADPH+0,312NAD= =BIOMAS+3,82ADP+0,364AKG+ +0,476NADP++0,312NADH+0,143CO_2

AC = acetat
ACCOA = acetil-coenzima A
AKG = α-cetoglutarat
ALA = alanină
ATP = adenozin 5'-trifosfat
BIOMAS = biomasă
CO_2 = dioxid de carbon
E4P = eritrozo-4-fosfat
FADH = flavin adenin dinucleotid redus
FRU6P = fructozo-6-fosfat
G3P = 3-fosfoglicerat
GAP = gliceraldehid-3-fosfat
GLC = glucoză
GLC6P = glucozo-6-fosfat
GLUM = glutamină
GLUT = acid glutamic
ISOCIT = izocitrat
LAC = lactat
LYSE = lizină, extracelulară
LYSI = lizină, intracelulară
MAL = malat
NADH = nicotinamid adenin dinucleotidă redusă
NADPH = nicotinamid adenin dinucleotidă fosfat redusă
NH_3 = amoniac
O_2 = oxigen
OAA = oxaloacetat
PEP = fenol piruvat
PYR = piruvat
RIB5P = ribozo-5-fosfat
RIBU5P = ribulozo-5-fosfat
SED7P = sedoheptulozo-7-fosfat
SUC = succinat
SUCCOA = succinat coenzima A
TREHAL = trehaloză
VAL = valină
XYL5P = xilulozo-5-fosfat

Fig. 9.6. Reacțiile implicate în biosinteza L-lizinei.

Alte reacţii de interes includ piruvatkinaza, *reacţia 7*, care întotdeauna prezintă un flux mic, datorită dominaţiei fosfoenolpiruvatului; glucozofosfotransferaza, *reacţia 18*, susţine întotdeauna un flux crescut, deoarece este prima reacţie ce permite încorporarea amoniacului liber în aminoacizi.

Analiza reţelei metabolice la *C. glutamicum*, realizată cu ajutorul datelor din literatură, a permis identificarea câtorva reacţii dependente, asociate cu reacţii anaplerotice, evidenţiate la bacteriile producătoare de acid glutamic. Cu ajutorul acestora, analizele intracelulare au încercat să identifice căile dominante.

Contrar publicaţiilor despre *B. flavum*, ocolirea glioxilatului pare a fi represată de prezenţa glucozei, ce părăseşte complexul fosfoenolpiruvat carboxilaza ca unică cale anaplerotică exprimată la *C. glutamicum* ATCC 21253.

Pentru a obţine un randament în lizină, din glucoză, cât mai apropiat de cel teoretic (75% molar), fluxul separat în punctele principale de ramificaţie (glucozo-6-fosfat, fosfoenolpiruvat şi piruvat) ale reacţiei metabolice primare de la *C. glutamicum* trebuie alterat semnificativ faţă de cel observat în timpul creşterii echilibrate, încât precursorii lizinei să fie sintetizaţi în raporturi stoechiometrice optime.

Distribuţiile fluxului la *C. glutamicum* din reţeaua metabolică, construite cu ajutorul datelor despre fermentaţie, au arătat că atât calea pentozofosfatului cât şi fosfoenolpiruvat carboxilazei susţin substanţial fluxul în timpul creşterii şi superproducţiei lizinei.

Analiza fluxului teoretic este utilă pentru consolidarea şi validarea reţelelor metabolice, identificarea punctelor de ramificaţii principale şi determinarea randamentelor teoretice maxime.

Cu toate acestea, există limitări în ceea ce priveşte extinderea rezultatelor care pot fi obţinute din distribuţiile fluxului experimental realizat pe sisteme neperturbate.

Analiza fluxului în timpul perturbărilor metabolice locale induse experimental poate fi folosită pentru elucidarea şi clarificarea posibilelor surse ale rigidităţii metabolice. În cazul superproducţiei lizinei la *C. glutamicum*, studiul perturbărilor a indicat faptul că punctele de ramificaţie glucozo-6-fosfat şi piruvat sunt flexibile şi randamentul lizinei pare a fi constrâns de flexibilitatea nodului fosfoenolpiruvat.

Recent, s-a descoperit o nouă metodă pentru determinarea fluxurilor din metabolismul central la *C. glutamicum*. Metoda combină capacitatea spectroscopiei de rezonanţă magnetică nucleară ^{1}H-detectoare de C^{13} de a urmări carbonii individuali, cu simplitatea stabilirii bilanţului carbonilor din culturile bacteriene. Astfel, la *C. glutamicum* s-a stabilit că fluxul ce urmează calea pentozo-fosfat este de 66,4% (relativ faţă de fluxul de intrare al glucozei, de 1,49 m mol/g greutate uscată şi h), intrarea în ciclul TCA de 62,2%, iar contribuţia succinilazei la sinteza lizinei de 13,7%.

Influenţa factorilor de mediu asupra biosintezei L-lizinei. L-Lizina, ca şi ceilalţi acizi organici, se obţine prin fermentaţie.

Randamentul de obţinere a L-lizinei şi viteza procesului de fermentaţie sunt influenţate de compoziţia mediului de cultură, aportul de oxigen, *p*H, agitare, temperatură şi durata fermentaţiei.

Compoziţia mediului de cultură are un rol hotărâtor în procesul de biosinteză al lizinei, deoarece microorganismul producător are nevoie de surse de carbon, azot, substanţe minerale, aminoacizi, iar toate acestea dozate în limite foarte strânse.

Sursa de carbon. Lizina se obţine industrial, pe un mediu de cultură glucozo-mineral, în condiţii de aerare şi la *p*H neutru. Cercetările efectuate au arătat că înlocuirea glucozei cu zaharoza măreşte producţia de lizină. Din acest punct de vedere, *melasa* este o foarte bună sursă de carbon pentru producţia de lizină.

Melasa este un subprodus rezultat din fabricarea zahărului din sfeclă de zahăr. Are o compoziţie complexă şi poate servi, în acelaşi timp, ca sursă de săruri minerale, aminoacizi şi vitamine.

Cercetările efectuate au demonstrat marea variabilitate chimică a melaselor. Variabilitatea este determinată atât de compoziţia diferită în aminoacizi, biotină, zaharoză invertită, *p*H, cât şi de substanţele dăunătoare, cum sunt: caramelul, substanţele melanoide, substanţele humice etc.

Melasele cu *p*H scăzut, cu un procent crescut de zaharoză invertită, la care lipsesc aminoacizi necesari biosintezei (metionină şi treonină), şi cu conţinut crescut în substanţe colorate (caramel, substanţe melanoide) conduc la rezultate scăzute în fermentaţie.

Melasele au fost delimitate în categorii de calitate: melase de calitatea I, care dau niveluri de biosinteză ridicată (40–45 g/l L-lizină × HCl), melase de calitatea a II-a, care dau niveluri medii de biosinteză (30–40 g/l L-lizină × HCl) şi melasă necorespunzătoare pentru biosinteza L-lizinei.

Activităţile medii în L-lizină obţinută pe materii prime de calitatea I au fost de 45 g/l în 66 ore de fermentaţie. În aceste condiţii, randamentul de transformare a atins valori maxime de 40%, randament care conform literaturii de specialitate este un randament optim [Săsărman S., 1979].

În afara melasei, s-au folosit şi alţi compuşi ca sursă de carbon. Astfel, în 1978, Bacina şi colaboratorii, citaţi de Săsărman E., au pus la punct un procedeu de biosinteză pe medii cu *acetat.*

Autorii cehi au folosit pentru biosinteza L-lizinei o mutantă de *Micrococcus glutamicus* şi un mediu conţinând *suc de sfeclă de zahăr, zahăr şi săruri minerale,* obţinând în 48 h de fermentaţie 22,2 g/l L-lizină. Pentru protejarea fermentaţiei de contaminări secundare care descompun lizina în cadaverină, au folosit o serie de inhibitori ca nitrofurazonă, furazolidonă şi acizi *p*-aminosalicilici.

Un grup de cercetători japonezi de la firma Ajinomoto au izolat o mutantă, denumită *B. lactofermentum* ATCC 21086, cu o productivitate de 40–52 g/l L-lizină. Biosinteza lizinei cu această mutantă se realizează pe un mediu conținând ca sursă de carbon: *glucoză, fructoză, maltoză, zaharoză, xiloză, hidrolizate de amidon, melase și acizi organici* în concentrație de 10–15%.

Firma japoneză Tokkoshia Co, Ltd, a elaborat un procedeu nou de obținere a L-lizinei, folosind ca sursă de carbon *acidul aspartic*. Acest procedeu a fost aplicat mutantei auxotrofe *C. acetophilum* NRLL B-3421.

În general, procedeele de biosinteză a L-lizinei în care sursa de carbon folosită este acidul acetic, acetatul de amoniu, sunt mai greu de efectuat întrucât concentrația acestora în mediu nu trebuie să depășească valoarea de 1,5%, necesitând adăugări intermitente.

Consumul de zahăr este lent în primele 24 de ore de fermentație, pentru ca în următoarele 25–26 de ore (etapa creșterii logaritmice a masei celulare) să crească foarte mult, după care scade în toată perioada biosintezei L-lizinei.

Pentru asigurarea surselor de carbon în timpul biosintezei L-lizinei se urmărește ca după 40 ore de fermentație cantitatea de zahăr să fie cuprinsă între 2,5–3%.

Sursa de azot. Necesarul de azot în procesul de biosinteză a L-lizinei este asigurat, pe de o parte de surse de azot organic, iar pe de altă parte de sursele de azot anorganic.

Ca *sursă de azot organic* se utilizează extractul de porumb și extractul de cartofi, preferabil fiind *extractul de porumb* care, este bogat în aminoacizi și oferă randamente superioare de biosinteză, precum și hidrolizat acid de șrot de soia, drojdie sau gluten.

Extractul de porumb, subprodusul rezultat din fabricarea glucozei din porumb, folosit în principal ca sursă de azot, poate fi în același timp și sursă de săruri minerale, în special pentru ionii de fosfor, precum și de vitamine. Analizele chimice ale extractelor de porumb au demonstrat o variabilitate mai mică a componentelor chimice, comparativ cu variabilitatea melaselor, fapt care s-a reflectat și asupra procesului de biosinteză a microorganismelor producătoare de lizină.

Recent, s-a elaborat un procedeu care constă în aceea că extractul de porumb se înlocuiește, în proporție de 80–84%, cu un *hidrolizat acid de șrot de soia, sau de drojdie, sau de gluten*. Prin aplicarea acestui procedeu, se lărgește gama de produse naturale utilizate ca sursă de azot și factori de creștere în biosinteza L-lizinei.

La o mutantă de *M. glutamicus* s-au folosit ca sursă de azot, de către autorii cehi, materii prime ieftine ca: *orz, paie și tărâțe*. În acest ultim caz, randamentele în L-lizină sunt mult mai scăzute. Când se folosesc ca sursă de azot *hidrolizate de miceliu* rezultate din producția industrială a penicilinei și tetraciclinei, activitățile în L-lizină ating valori de 40,5 g/l în 38 ore de fermentație.

Autorii japonezi au folosit pentru sinteza L-lizinei cu mutante duble provenite din genul *Corynebacterium* cu sursă de *azot făină de peşte, bulion, casaminoacid, extracte solubile de peşte, extracte din paie de orez*, adăugate separat sau în diferite combinaţii (în plus faţă de mediile clasice).

Ca *surse de azot anorganic* se folosesc *săruri de amoniu* în cantitate de 1,2–3,5%, iar corectarea *p*H-ului pe tot parcursul fermentaţiei se realizează cu ape amoniacale. Azotul total din lichidul de cultură ajunge la 6,5–8,5%.

O mutantă denumită *B. lactofermentum* ATCC 21086, izolată la firma Ajinomoto, prezintă o productivitate de 40–52 g/l L-lizină, folosindu-se ca sursă de azot săruri de amoniu, şi anume: $ClNH_4$, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2CO_3$, amoniac gazos sau în soluţie.

Dintre toate sursele de azot, *sulfatul de amoniu* dă cele mai bune rezultate; un adaos de „corn-steep liqueur" (extract de porumb) până la concentraţia de 4% măreşte, de asemenea, producţia de lizină.

Sărurile minerale. Prezenţa substanţelor minerale este vitală în procesul de creştere a masei celulare, deoarece ele reglează atât permeabilitatea ţesutului celular, cât şi echilibrul ionic.

În cazul folosirii unui amestec de săruri minerale (fosfat de K, sulfat de Mg, Mn, Zn şi Fe), într-o fermentaţie realizată cu *B. lactofermentum* ATCC 21086, s-a obţinut o productivitate de 40–52 g/l L-lizină.

Aminoacizii. S-a dovedit că nivelul producţiei L-lizinei este controlat şi de aminoacizii din mediul nutritiv. Prezenţa *biotinei* şi a *homoserinei* în mediu este esenţială.

S-a descoperit că adăugarea *L-metioninei* în mediul de obţinere a tulpinii de tip sălbatic *C. glutamicum* are drept consecinţă excreţia L-lizinei până la 2,5*n* mol/min/mg (greutate uscată).

La *Brevibacterium sp.* P_{1-13} s-a observat că atât creşterea masei celulare, cât şi producţia L-lizinei prezintă proporţii crescute în urma adăugirii *DL-izoleucinei* şi *L-leucinei*.

9.2.1.5. Influenţa *p*H-ului şi a temperaturii asupra biosintezei L-lizinei

Studii efectuate au arătat că valoarea *p*H-ului, înainte de sterilizare, nu influenţează semnificativ nivelul de biosinteză. Cunoscut fiind faptul că, la temperaturi ridicate şi la valori de *p*H acide, pot avea loc degradări ale mediului prin formarea de compuşi de tip melanoidic (aminoglucide), iar la valori alcaline are loc degradarea zaharozei în caramel, se recomandă ca valori optime de *p*H cele cuprinse între 6 şi 7.

În procesul de fermentaţie se remarcă, în primele 30–35 de ore, o puternică tendinţă de scădere a *p*H-ului, iar menţinerea sa la valoarea optimă (7–7,2) se face cu hidroxid de amoniu.

După 24–30 ore începe acumularea de L-lizină şi ca urmare *p*H-ul creşte spre sfârşitul biosintezei până la 8–8,2.

Temperatura optimă de biosinteză este de 32°C. La 28°C biosinteza lizinei este lentă, în timp ce la 37°C randamentele în lizină sunt foarte scăzute.

Influenţa aeraţiei asupra biosintezei L-lizinei. Aeraţia reprezintă un factor extrem de important în biosinteza aminoacizilor.

Zaiţeva, citată de Săsărman E., a stabilit că mutantele auxotrofe derivate din tulpini sălbatice de *Micrococcus*, în condiţiile la care se asigură o viteză de dizolvare a oxigenului egală cu 48–50 mg/l/min, conduc la activităţi maxime în L-lizină (25 g/l). Când nivelul oxigenului dizolvat din mediu scade sub optim, biosinteza se deplasează înspre formarea alaninei, valinei sau acidului lactic. Legat de problemele de aeraţie intensă pe care le necesită tulpina şi ţinând cont de faptul că aerul steril necesar în fermentaţiile industriale are un preţ de cost limitat, Mindlin, citat de Săsărman E., a indus, cu radiaţii UV şi cu dietil sulfat, *mutante pitice*, care au păstrat caracteristica de a produce L-lizină a tulpinilor iniţiale, dar s-au deosebit de acestea prin faptul că au necesitat un debit mai mic de aerare pe parcursul biosintezei. Mai mult, mutantele pitice au format cantităţi mici de aminoacizi secundari.

Influenţa calităţii materiilor prime asupra biosintezei L-lizinei. Randamentul de biosinteză al lizinei depinde foarte mult de calitatea materiilor prime folosite şi în primul rând al melasei şi al extractului de porumb.

Studiul asupra evoluţiei curbelor de creştere a producătorului *B. lactofermentum* ICCF-3 [Săsărman S., 1979] pe medii de fermentaţie cu materii prime de diferite provenienţe, a evidenţiat următoarele:

– pe *materii prime de calitate corespunzătoare*, curba de dezvoltare a fost tipică, evidenţiindu-se o fază *lag* slab exprimată, datorită raportului de însămânţare ridicat în fermentaţie (10%), o fază logaritmică, o fază staţionară şi o fază de declin. S-a observat, de asemenea, că este necesară acumularea unei anumite cantităţi de biomasă, ceea ce a permis tragerea concluziei că biosinteza L-lizinei este direct proporţională cu acumularea de biomasă în anumite limite;

– pe *materii prime necorespunzătoare*, curba de multiplicare este atipică: se observă o prelungire a fazei de *lag*, urmată de instalarea fazei exponenţiale pe tot parcursul fermentaţiei. Cantitativ, se formează mai puţină biomasă decât în primul caz. În general, nivelul de biosinteză realizat în fermentaţii cu acest tip de dezvoltare este sub nivelul atins de biomasa formată pe materii prime corespunzătoare.

Componentele optime ale unui mediu de fermentaţie. În urma cercetărilor efectuate, s-au stabilit componentele optime ale unui mediu de fermentaţie. Astfel, Kikova şi colaboratorii au obţinut 21,3 g valină/dm^3 şi 13,5 g lizină/dm^3 pe un mediu de fermentaţie ale cărui componente optime erau reprezentate de: 25% melasă, 3,5% $(NH_4)_2SO_4$ şi 0,075% KH_2PO_4.

În țara noastră, în fermentațiile industriale, s-au folosit medii de cultură ce conțineau 3% extract de porumb, 10–12% melasă, calculată în zaharoză, 3% săruri de amoniu, 0,02% sulfat de zinc, magneziu, mangan, superfosfat de calciu, 1% carbonat de calciu și 0,2% ulei [Săsărman S., 1979].

Recent, s-a stabilit un nou proces de fermentație *pentru superproducerea simultană a lizinei și acidului glutamic*. Acest proces constă în cultivarea unei tulpini producătoare de lizină folosind metode utilizate pentru producerea acidului glutamic, și anume cultivare cu agenți tensioactivi ori penicilină. Fără a se adăuga $(NH_4)_2SO_4$ în mediu, s-a obținut producerea simultană a lizinei și acidului glutamic, cu o productivitate de 1,3–1,4 ori mai mare.

În ceea ce privește producția mondială de lizină, Japonia se află pe primul loc, deoarece a reușit să obțină în cultură continuă 80–100% lizină.

În țara noastră s-a obținut între anii 1970–1972, prin lucrări de mutageneză cu radiații UV și cu nitrozoguanidină, o mutantă auxotrofă de biotină și homoserină, folosind ca tulpină parentală *B. lactofermentum* ATCC 13896, desemnată sub denumirea de *B. lactofermentum* ICCF-3 și care produce 35–45 g/l lizină.

Procedeul a fost industrializat în 1973 la Fabrica de Antibiotice din Iași, obținându-se 37,5–40 g/l L-lizină. Produsul de uz furajer s-a obținut printr-un procedeu de atomizare, pe suport de carbonat de calciu. Conținutul în L-lizină × HCl în produs a fost de minimum 10%.

Din mediul de fermentație, s-a pus la punct un procedeu de purificare a L-lizinei în cadrul secției Biosinteze a Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice București, obținându-se un produs de uz farmaceutic, utilizat în producția de vaccinuri (în compoziția mediilor de cultură), la Institutul Cantacuzino [Jurcoane Șt. și colab., 1986].

9.2.1.6. Izolarea și purificarea L-lizinei din medii de biosinteză

L-lizina se obține printr-un proces de biosinteză pe medii care au în componență subproduse ale industriei alimentare (melasă și extract de porumb). În vederea recuperării L-lizinei din mediul de fermentație, este necesară o clarificare avansată a acestuia pentru a ușura prelucrarea ulterioară.

Izolarea L-lizinei din mediul de fermentație perfect limpede, rezultat în urma filtrării, se realizează prin: reținerea pe coloana de schimbători de ioni, de tip cationit puternic acid; eluare cu soluție de amoniac; concentrare până la îndepărtarea totală a amoniacului; tratare cu acid clorhidric concentrat pentru a transforma L-lizina în monoclorhidrat; concentrare în continuare până la apariția cristalelor. Perfectarea cristalizării se face cu alcool etilic 96%. După recristalizare, din soluția apoasă în prezența alcoolului etilic se obține produsul finit cu conținut de minimum 98% L-lizină. Schema operațiilor principale poate fi urmărită în figura 9.7, iar schema tehnologică în figura 9.8.

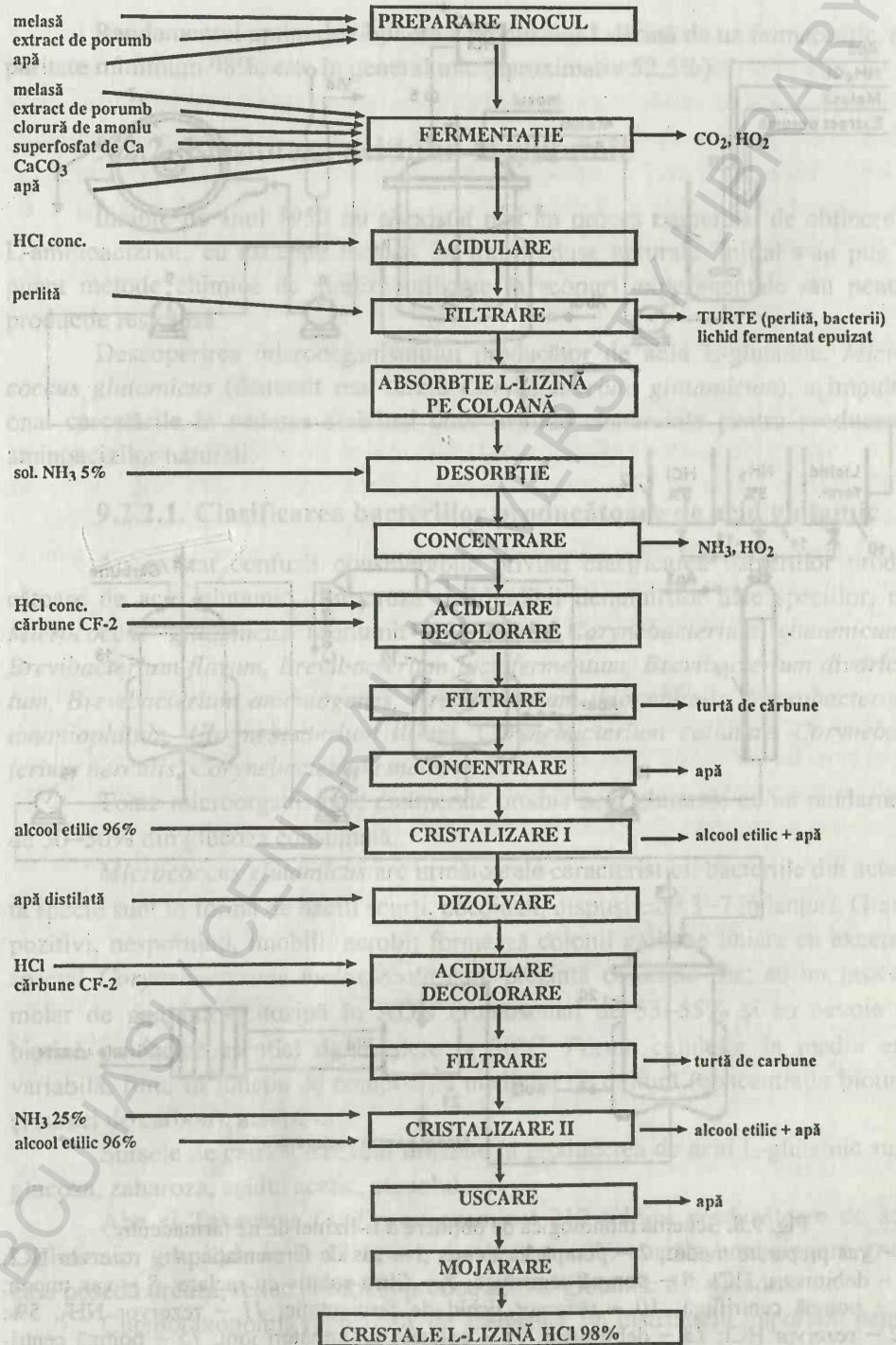


Fig. 9.7. Schema operațiilor principale.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

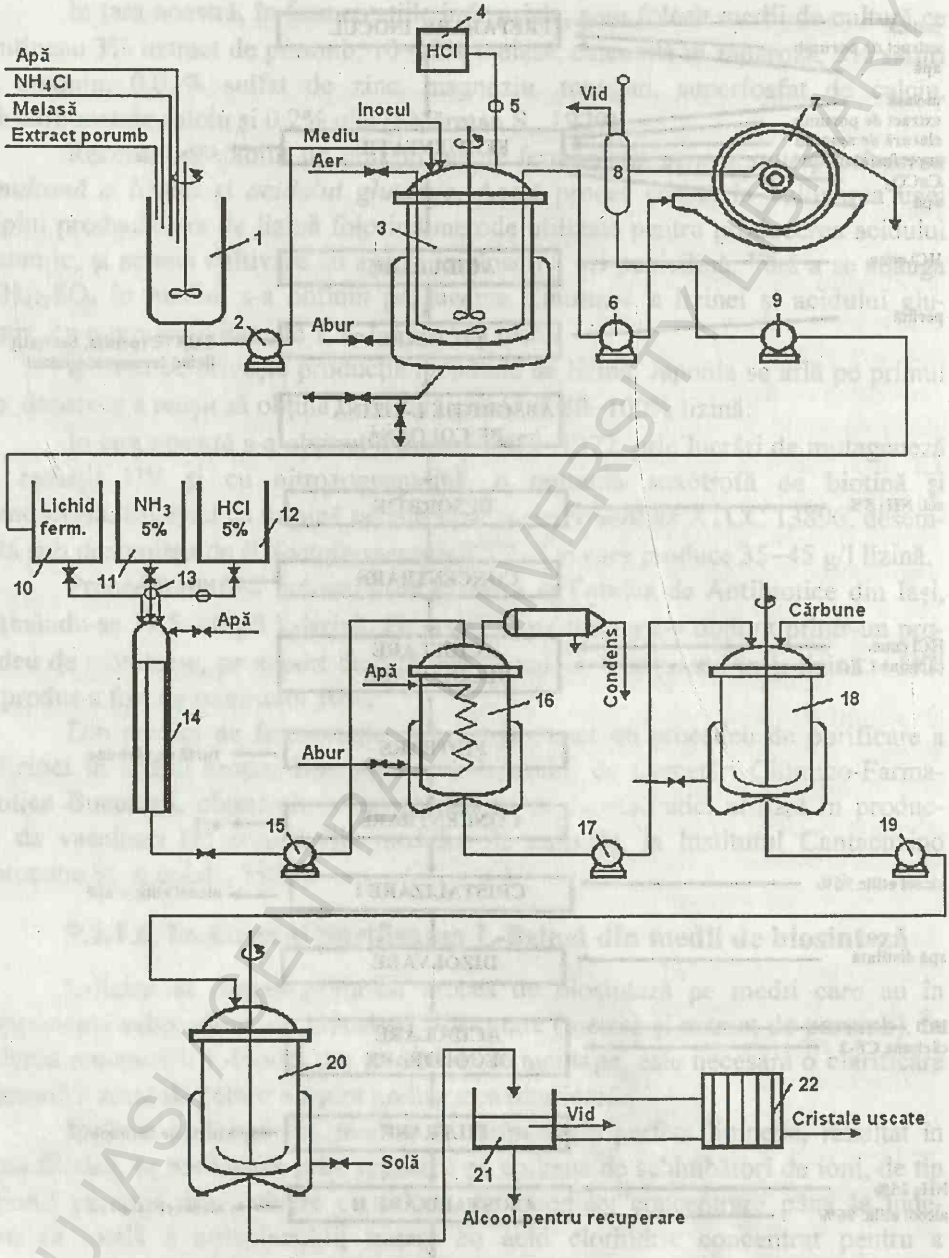


Fig. 9.8. Schema tehnologică de obținere a L-lizinei de uz farmaceutic:
1 – vas preparare mediu; *2* – pompă încărcare; *3* – vas de fermentație; *4* – rezervor HCl; *5* – debitmetru HCl; *6* – pompă centrifugă; *7* – filtru rotativ cu raclare; *8* – vas tmpon; *9* – pompă centrifugă; *10* – rezervor lichid de fermentație; *11* – rezervor NH_3, 5%; *12* – rezervor HCl; *13* – debitmetre; *14* – coloană schimbători ioni; *15* – pompă centrifugă; *16* – concentrator; *17* – pompă; *18* – vas dizolvare și purificare; *19* – pompă; *20* – cristalizator; *21* – filtru Nutsche; *22* – uscător.

BCU IAȘI - CENTRALĂ - UNIVERSITY LIBRARY

Randamentul optim de obținere a produsului L-lizină de uz farmaceutic, de puritate minimum 98%, este în general mic (aproximativ 52,5%).

9.2.2. Biosinteza acidului L-glutamic

Înainte de anul 1950 nu a existat nici un proces comercial de obținere a L-aminoacizilor, cu excepția izolării lor din produse naturale. Inițial s-au pus la punct metode chimice de sinteză utilizate în scopuri experimentale sau pentru producție restrânsă.

Descoperirea microorganismului producător de acid L-glutamic, *Micrococcus glutamicus* (denumit mai târziu *Corynebaterium glutamicum*), a impulsionat cercetările în vederea stabilirii unor metode comerciale pentru producerea aminoacizilor naturali.

9.2.2.1. Clasificarea bacteriilor producătoare de acid glutamic

Au existat confuzii considerabile privind clasificarea bacteriilor producătoare de acid glutamic, din cauza multitudinii denumirilor date speciilor, ca: *Micrococcus glutamicus* (denumit mai târziu *Corynebacterium glutamicum*), *Brevibacterium flavum, Brevibacterium lactofermentum, Brevibacterium divaricatum, Brevibacterium amoniogenes, Brevibacterium thiogenitalis, Microbacterium amoniophilum, Corynebacterium lilium, Corynebacterium callunae, Corynebacterium herculis, Corynebacterium melassecola.*

Toate microorganismele enumerate produc acid glutamic cu un randament de 30–50% din glucoza consumată.

Micrococcus glutamicus are următoarele caracteristici: bacteriile din această specie sunt în formă de bacili scurți, cocoidali, dispuși câte 3–7 în lanțuri, Gram-pozitivi, nesporulați, imobili, aerobi; formează colonii galbene liniare cu excepția speciei *Corynebacterium melassecola* care prezintă coloratie roz; au un procent molar de guanină + citozină în ADN cromosomal de 53–55% și au nevoie de biotină ca factor esențial de creștere la 30°C. Forma celulelor în mediu este variabilă, fiind în funcție de compoziția mediului de cultură (concentrația biotinei și sursei de carbon), aerație etc.

Sursele de carbon frecvent utilizate în producerea de acid L-glutamic sunt: glucoza, zaharoza, acidul acetic, etanolul.

Abe și Takayama (1972) au examinat 212 tulpini producătoare de acid L-glutamic, grupându-le în 12 tipuri, dintre care 60% aparțin unei singure grupe care posedă urează, reduc nitrații și produc acid L-glutamic din glucoză.

Chemotaxonomia reprezintă, de asemenea, un instrument important pentru clasificarea și identificarea acestor microorganisme. Denumirea de *Micrococcus glutamicus*, la care este prezent acidul mezodiaminopimelic în peretele celular, a

fost schimbată în *Corynebacterium*. Tulpinile de *Corynebacterium* au fost incluse în 13 grupuri şi definite drept *Corynebacterium sensum stricto*, şi anume cele care conţin în peretele celular acid mezodiaminopimelic, arabinoză, galactoză, acid micotic (22–38 atomi de carbon în lanţ), MK-8 sau MK-9 ca menakinonă majoră şi 51–59% molar de *G* + *C* în ADN. Această definiţie este comparabilă cu clasificarea propusă de Yamada şi Kamagata pentru bacteriile aparţinând grupului T de *Corynebacterium*, evidenţiindu-se de asemenea o bună omologie ADN .

În concluzie, pe baza datelor de taxonomie convenţională, chemotaxonomie şi omologie ADN, se poate considera că tulpinile producătoare de acid glutamic pot fi incluse într-o singură specie a genului *Corynebacterium*.

9.2.2.2. Metabolismul glucidelor

Bacteriile producătoare de acid L glutamic au de obicei formă de bastonaşe şi tind spre o formă de V în timpul diviziunii. Dacă tulpinile sunt cultivate pe un mediu bogat, nu se observă un pleomorfism accentuat. Alungirea, creşterea şi ramificarea are loc frecvent când bacteria este cultivată în mediu cu concentraţie mică de biotină şi în prezenţa unui antibiotic.

Corynebacterium glutamicum asimilează glucoza, fructoza, zaharoza, maltoza şi riboza.

Din studiile efectuate pe acest microorganism s-a stabilit că degradarea glucozei la piruvat poate avea loc atât pe calea Embden Meyerhof Parnas (EMP), cât şi prin şuntul hexozomonofosfaţilor (HMP). În cazul HMP au fost evidenţiate două enzime cheie ale şuntului şi anume: glucozo 6-fosfat dehidrogenaza şi 6-fosfogluconat dehidrogenaza, ambele dependente de NADP. Tulpina biosintetizează concentraţii ridicate de acid L-glutamic din glucoză sau D-riboză, ceea ce demonstrează că această cale este operativă. Enzimele căii EMP au fost identificate la *B. flavum* şi anume: hexokinaza, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, triozofosfat izomeraza, fosfogliceratkinaza, enolaza, fosfogliceromutaza şi piruvatkinaza.

În condiţiile de aerare predomină şuntul HMP, favorizând acumularea glutamatului. În condiţiile anaerobe predomină calea EMP, ceea ce duce la acumularea acidului lactic. De aceea, echilibrul dintre condiţiile aerobe şi cele anaerobe este unul dintre factorii importanţi care controlează producţia glutamatului.

În ceea ce priveşte calea de biosinteză care porneşte de la compuşii C3 ai ciclului acizilor tricarboxilici (TCA), studii folosind carbonul marcat radioactiv au demonstrat pentru *Corynebacterium glutamicum* că $^{13}CO_2$ a fost fixat în poziţia C1 a glutamatului, în prezenţa piruvatului şi a enzimei malice NADP specifice care, probabil, participă la fixarea CO_2. Prezenţa fosfoenolpiruvat (PEP) carboxilază (fig. 9.9) s-a demonstrat a avea un rol cheie în intrarea compuşilor C3 în ciclul TCA. PEP-carboxilaza este supusă inhibiţiei feed-back severe prin acid aspartic, dar este activată de fructozo-1,6-difosfat sau acetil CoA. Inhibiţia este înlăturată de acetil CoA.

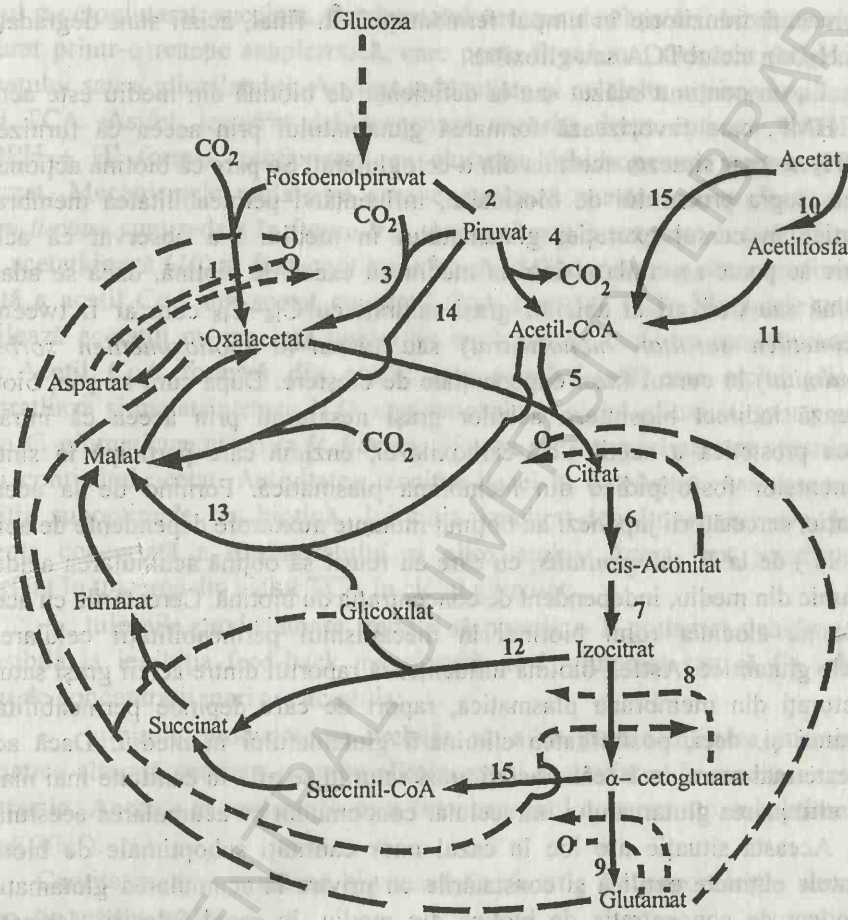


Fig. 9.9. Calea de biosinteză a acidului L-glutamic:
1 – fosfoenol-piruvat carboxilaza; *2* – piruvat kinaza; *3* – piruvat carboxilaza; *4* – piruvat dehidrogenaza; *5* – citrat sintaza; *6*; *7* – aconitaza; *8* – izocitrat dehidrogenaza; *9* – glutamat dehidrogenaza; *10* – acetatkinaza; *11* – fosfat acetil transferaza; *12* – izocitrat liaza; *13* – malat sintetaza; *14* – enzima malică; *15* – α-cetoglutarat dehidrogenaza; → inhibiție; – – – O represie. (După Shiio și Sugimoto,1981.)

9.2.2.3. Rolul biotinei în biosinteza acidului L-glutamic

Alt factor care influențează biosinteza glutamatului este conținutul de biotină din mediu. Astfel, la un conținut maxim de biotină, glutamatul sintetizat nu este excretat în mediu și se acumulează intracelular. Prezența unei concentrații ridicate de glutamat din celulă inhibă direct sau indirect citrat sintaza, conducând la o creștere intracelulară a aspartatului. Ca urmare este inhibată PEP carboxilaza, se acumulează piruvatul care este convertit la lactat sau succinat. Acești acizi organici

ROMANIAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

au o prezență tranzitorie în timpul fermentației. În final, acizii sunt degradați la CO_2 și H_2O în ciclul TCA sau glioxilat.

La un conținut scăzut sau la deficiență de biotină din mediu este activat șuntul HMP, care favorizează formarea glutamatului prin aceea că furnizează $NADPH_2$ necesar sintezei acestuia din α-cetoglutarat. Se pare că biotina acționează indirect asupra procesului de biosinteză, influențând permeabilitatea membranei plasmatice în cursul excreției glutamatului în mediu. S-a observat că acidul glutamic se poate acumula și într-un mediu cu exces de biotină, dacă se adaugă penicilină sau derivați ai acizilor grași saturați cu C_{16}–C_{18} cum ar fi tween-60 (*polioximetilen sorbitan monostearat*) sau tween-40 (*polioximetilen sorbitan monopalmitat*) în cursul fazei exponențiale de creștere. După cum se știe, biotina catalizează indirect biosinteza acizilor grași nesaturați prin aceea că intră în gruparea prostetică a acetil CoA-carboxilazei, enzimă care participă la sinteza componentelor fosfolipidice din membrana plasmatică. Pornind de la această observație, cercetătorii japonezi au obținut mutante auxotrofe dependente de acidul oleic (ole$^-$) de la *B. thiogenitalis*, cu care au reușit să obțină acumularea acidului L-glutamic din mediu, independent de concentrația de biotină. Cercetările cu aceste mutante au elucidat rolul biotinei în mecanismul permeabilității celulare la bacteriile glutamice. Astfel, biotina influențează raportul dintre acizii grași saturați și nesaturați din membrana plasmatică, raport de care depinde permeabilitatea membranei și, deci, posibilitatea eliminării glutamatului în mediu. Dacă acest raport este mai mare de 1 (când acizii grași saturați se află în cantitate mai mare), are loc eliminarea glutamatului intracelular concomitent cu acumularea acestuia în mediu. Această situație are loc în cazul unor cantități suboptimale de biotină. Rezultatele obținute explică și constatările cu privire la acumularea glutamatului independent de concentrația de biotină din mediu, în cazul folosirii derivaților acizilor grași saturați. Aceștia modifică echilibrul dintre acizii grași saturați și cei nesaturați și, respectiv, a fosfolipidelor din membrana plasmatică, prin faptul că inhibă activitatea acetil CoA-carboxilazei, enzimă implicată, în principal, în sinteza acizilor grași nesaturați. Ca urmare, raportul acizi grași saturați/acizi grași nesaturați va fi mai mare decât 1. Adăugarea penicilinei în faza *lag* de creștere inhibă sinteza peretelui celular, iar membrana celulară va fi supusă variațiilor de presiune osmotică, ceea ce are drept rezultat modificarea permeabilității acesteia, deci posibilitatea acumulării extracelulare a glutamatului.

Reglarea biosintezei acidului L-glutamic. Biosinteza acidului L-glutamic a fost studiată în fermentați cu o tulpină de *Bacterium flavum*, care trebuie să întrunească următoarele caracteristici pentru exprimarea întregului potențial productiv:

– tulpinile producătoare trebuie să aibă o activitate scăzută sau să fie lipsite de α-cetoglutarat dehidrogenază, pentru ca acidul α-cetoglutaric sintetizat să nu poată fi transformat în acid succinic, ci să fie aminat la glutamat de către glutamat dehidrogenază. Prin aceasta, însă, are loc o inhibiție a ciclului TCA la

nivelul α-cetoglutarat, succinat. Oxalacetatul necesar desfăşurării biosintezei va fi procurat printr-o reacţie anaplerotică, care poate fi cel mai frecvent carboxilarea piruvatului sau a glioxilatului. Au fost evidenţiate şi celelalte enzime implicate în ciclul TCA. Astfel, izocitrat dehidrogenaza necesită drept cofactor NADP, iar NADPH + H^+ format reacţionează cu glutamat dehidrogenaza pentru a forma glutamat. Mecanismele reglatoare care controlează aceste enzime la *Brevibacterium flavum* sunt redate în figura 9.9. Acetatul este încorporat în acetil CoA de către acetatkinază (*10*) şi fosfacetil transferază (*11*), dar nu s-a observat formarea directă a acetil CoA din acetat cu acetil CoA sintetază (*15*). Mutantele care nu asimilează acetatul nu prezintă unele din enzimele de mai sus sau izocitratliaza (*12*). Acetil CoA formată din acetat este metabolizată prin ciclul glioxilat. Izocitratliaza şi malatsintetaza (*13*), enzime cheie în ciclul glioxilat, sunt prezente atât la *C. glutamicum* cât şi la *B. flavum.* Sinteza acestor enzime este stimulată pe medii conţinând acetat. Activitatea izocitrat-liazei la *C. glutamicum* descreşte în condiţii suboptimale de biotină. Inhibiţia izocitrat-dehidrogenazei are loc în prezenţa concertată a oxalacetatului şi glioxilatului. Acest fapt joacă un rol important în trecerea din ciclul TCA în ciclul glioxilat;

– tulpinile producătoare trebuie să posede o L-glutamat dehidrogenază insensibilă la inhibiţia feed-back manifestată de L-glutamat sau să fie inhibată *numai* de concentraţii mari ale acestuia;

– tulpinile producătoare trebuie să aibă permeabilitatea membranei plasmatice alterată pentru a permite eliminarea şi acumularea în mediu a acidului L-glutamic. Aceasta se realizează prin folosirea unei concentraţii suboptimale de biotină (bio^-).

Cantitatea de biotină se ajustează, în funcţie de concentraţia sursei de carbon din mediu, astfel:

– 1,5–2,0 μg/l, pentru 5 % zaharoză (sau alt glucid);
– 2,0–3,0 μg/l, pentru 10% zaharoză (sau alt glucid);
– 4,0–8,0 μg/l, pentru 15% zaharoză (sau alt glucid);
– 7,0–10,0 μg/l, pentru 20 % zaharoză (sau alt glucid).

Independent de concentraţia de biotină din mediu, acumularea acidului L-glutamic se poate obţine prin adaos de penicilină sau derivaţi ai acizilor graşi saturaţi, sau prin folosirea mutantelor auxotrofe de acid oleic (ole^-).

9.2.2.4. Producerea industrială a acidului L-glutamic

Mediul de cultură pentru producerea industrială a acidului L-glutamic trebuie să conţină o sursă de carbon, reprezentată de obicei de glucoză în concentraţii de 10–12 %; o sursă de azot reprezentată de săruri de amoniu, uree, extract de porumb, hidrolizat de soia, săruri de Ca, K, Mg, ale anionilor SO_4^{2-} şi PO_4^{3-}; metalelor Fe, Zn, Mn, Co, trebuie să fie sub formă de urme, ca şi biotina.

În prezent, în locul glucozei tehnice ce foloseşte melasa ca sursă de carbon sau un amestec de glucoză, fructoză şi zaharoză, care dau rezultate mai bune decât glucoza pură. Aceasta se datorează prezenţei în melasă a acizilor organici.

*p*H-ul se ajustează la 6,8–7 şi apoi mediul steril se inoculează cu o cultură de 10–15 ore într-un raport de 5–10 %. În cursul desfăşurării procesului, temperatura se menţine la 31°C, cu o bună aerare, iar *p*H-ul se menţine între valorile 6,0 şi 7,5 cu NH_4OH, care se adaugă continuu, în scopul orientării echilibrului în favoarea aminării reductive a acidului α-cetoglutaric. În aceste condiţii, procesul decurge în două faze. În prima fază (8–12 h) are loc multiplicarea microorganismului, în cea de-a doua fază are loc acumularea acidului L-glutamic, procesul fiind încheiat în 30–35 de ore. La o concentraţie de 100 g/l sursă de carbon, se obţin 50–60 g/l acid L-glutamic.

Aeraţia bună reprezintă un factor foarte important în desfăşurarea procesului cu randament de transformare ridicat.

Producerea de glutamat pe bază de etanol ca sursă de carbon s-a realizat cu specii de *Brevibacterium*, obţinându-se randamente de 60 g/l glutamat.

Tulpinile care folosesc etanolul necesită biotină ca factor de creştere şi răspund la limitarea concentraţiei de biotină în mod similar cu tulpinile care folosesc glucidele ca sursă de carbon.

Producerea de glutamat pe bază de *n*-parafine s-a realizat cu o tulpină auxotrofă de glicerol, *C. alkanolyticum*, obţinându-se 40 g/l glutamat.

În România s-a pus la punct un procedeu de biosinteză a glutamatului. Prin lucrări de mutageneză cu radiaţii γ, folosind ca tulpină parentală *Brevibacterium lactofermentum*, s-a obţinut o mutantă care produce pe un mediu standardizat (glucoză 10–12 %, extract de porumb 0,3% ca substanţă uscată; uree 2–3 %, fosfaţi mono- şi bipotasic câte 0,1 respectiv 0,15%, sulfat de magneziu 0,05 %) – 60–70 g/l glutamat, în condiţii de aeraţie puternică. Timpul de fermentaţie este de 30–36 h [Săsărman şi colab.].

9.2.2.5. Utilizarea acidului glutamic

Acidul L-glutamic se foloseşte în medicină la tratarea bolilor sistemului nervos, deoarece întreţine şi ameliorează metabolismul creierului. S-a folosit la tratarea schizofreniei, epilepsiei, a urmărilor meningitei, encefalitei, poliomielitei. Întreţine nivelul de oxigenare a ţesutului cerebral. Se presupune că acidul L-glutamic absoarbe amoniacul format în ţesuturi transformându-l în glutamină, îndepărtând astfel fenomenul de oboseală şi intoxicaţie.

În industria alimentară se foloseşte drept condiment pentru ameliorarea gustului conservelor din carne, peşte şi legume. Adăugarea în cantitate de 0,1–0,5%, raportat la greutatea produselor, contribuie la accentuarea gustului natural al produselor alimentare, făcându-le mai plăcute.

În zootehnie este introdus în hrana suinelor.

10. ANTIBIOTICE

10.1. NOȚIUNI GENERALE

Antibioticele se numără printre produsele farmaceutice majore ale biotehnologiilor microbiene, alături de alcaloizi, intermediari steroidici şi o serie de peptide şi proteine terapeutice.

Din punct de vedere farmacologic, antibioticele sunt compuşi chimici care se caracterizează prin proprietatea de a distruge sau de a inhiba, în mod selectiv, dezvoltarea unor microorganisme patogene (agenți etiologici ai unor boli infecțioase), fără a afecta organismul gazdă, ele încadrându-se în clasa medicamentelor chimioterapice.

Inițial, termenul de antibiotic a fost atribuit, în legătură cu fenomenul de antibioză, numai substanțelor produse de metabolismul microbian care aveau proprietatea de a distruge sau de a inhiba înmulțirea bacteriilor şi a altor microorganisme; ulterior, în această categorie au fost incluse şi substanțele cu acțiune antimicrobiană obținute prin semisinteză, respectiv prin modificarea chimică a antibioticelor naturale sau a unor derivați ai acestora.

Pe lângă antibioticele naturale şi de semisinteză, există şi medicamente chimioterapice antimicrobiene care se obțin exclusiv prin procedee de sinteză chimică (sulfamide, chinolone, imidazoli).

Cu toate că multe din antibioticele naturale s-ar putea obține teoretic şi prin sinteză chimică, practic, această metodă nu poate concura la scară industrială tehnologiile de biosinteză microbiană, datorită complexității etapelor de sinteză chimică şi a cheltuielilor mari implicate de acestea. Deşi randamentele de izolare a antibioticelor din mediile de biosinteză sunt relativ scăzute în majoritatea proceselor industriale, valoarea terapeutică ridicată şi, în consecință, valoarea comercială ridicată a acestor substanțe justifică utilizarea tehnologiilor de biosinteză pentru producerea lor.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

10.1.1. Clasificarea antibioticelor

Având în vedere numărul mare de antibiotice de proveniență diferită, cu structuri chimice şi proprietăți fizico-chimice şi farmaco-terapeutice diferite, pentru clasificarea acestor medicamente se pot lua în considerare mai multe criterii şi anume: structura chimică, tipul de microorganism producător, spectrul de activitate antimicrobiană, tipul de efect asupra populației microbiene, mecanismul de acțiune, acțiunea predominantă asupra unui anumit agent patogen (tuberculostatice, antifungice), acțiunea electivă în infecții localizate (antibiotice pentru infecții intestinale, antibiotice pentru infecții ale căilor respiratorii superioare etc.).

a) ***Clasificarea antibioticelor în funcție de structura chimică.*** Antibioticele pot fi grupate în *familii* caracterizate printr-un element structural comun, după cum rezultă din tabelul 10.1. Acest criteriu de clasificare nu permite însă explicarea diferenței dintre acțiunile terapeutice ale unor antibiotice din aceeaşi familie şi nici a similitudinii acțiunilor terapeutice ale unor antibiotice din familii diferite.

b) ***Clasificarea antibioticelor în funcție de microorganismul producător.*** Majoritatea antibioticelor obținute la scară industrială sunt produse de fungi filamentoşi şi de bacterii din grupul actinomicetelor, care sunt prezentate în tabelul 10.2.

c) ***Clasificarea antibioticelor în funcție dę spectrul de activitate.*** Totalitatea microorganismelor sensibile la un antibiotic formează spectrul antimicrobian al antibioticului respectiv. În general, bacteriile Gram-pozitive sunt mai sensibile la antibiotice decât cele Gram-negative, deşi există şi antibiotice care acționează numai asupra bacteriilor Gram-negative. Spectrul de activitate reprezintă un criteriu de clasificare a antibioticelor (fig. 10.1) util din punct de vedere terapeutic, pe baza căruia se diferențiază:

– antibiotice cu spectru îngust de tip benzilpenicilină, cuprinzând penicilinele G şi V, alte peniciline asemănătoare, eritromicina, vancomicina, clindamicina, care sunt active față de coci Gram-pozitivi şi Gram-negativi şi față de bacili Gram-pozitivi;

– antibiotice cu spectru îngust de tip streptomicină (aminoglicozide, polimixine), care sunt active față de coci Gram-pozitivi şi Gram-negativi şi, în mod caracteristic, față de bacili Gram-negativi;

– antibiotice cu spectru larg de tip tetraciclină, în care sunt incluse tetraciclinele, cloramfenicolul, ampicilina, amoxicilina şi alte peniciline asemănătoare, cefalosporinele, care pot afecta cocii şi bacilii Gram-pozitivi şi Gram-negativi, spirochetele, micoplasmele, rickettsiile şi chlamidiile.

Tabelul 10.1

Clasificarea principalelor antibiotice în funcție de structura chimică

Element structural caracteristic	Denumiri substanțe active	Denumiri produse comerciale
1	2	3
A. *Nucleu* β-*lactamic*	1. Peniciline naturale	
	a) Benzilpenicilină	Penicilina G potasică, Penicilina G sodică
	b) Fenoximetilpenicilină	Penicilina V, Cliacil, Megacillin, Ospen
	2. Peniciline retard	
	a) Benzatin benzilpenicilină	Moldamin, Retarpen
	b) Procain penicilină G	Efitard, Fortepen
	3. Peniciline de semisinteză	
	a) Amoxicilină	Amopen, Amox, Amoxicilină, Amoxifarm, Amoxil, Dispamox, Duomox, E-Mox, Ephamox, Farconcil, Izoltil, Julphamox, Moxilen, Ospamox etc.
	b) Ampicilină	Ampen, Ampicilină, Ampidar, Ephicilin, Epicocilin, Pamecil, Pentrexil, Standacillin
	c) Carbenicilină	Carbenicilină
	d) Oxacilină	Oxacilină, Oxalin, Prostaphlin
	4. Cefalosporine	
	a) Cefaclor	CEC, Ceclodyne, Ceclor, Cefaclor, Cloracef, Medoclor, Sinclor, Vercef etc.
	b) Cefadroxil	Biodroxil, Cedrox, Cefadroxil, Cexyl, Droxyl, Duracef, Odoxil
	c) Cefalexin	Cefalexin, Cefalin, Farmalexin, Keflex, Keforal, Oracef, Ospexin
	d) Cefalotină	Cefalotină
	e) Cefamandol	Cefamandol, Mandol
	f) Cefapirin	Cefatrexyl
	g) Cefatrizin	Gertemycin, Specicef-N
	5. Alte antibiotice β-lactamice	
	a) Carbapeneme	Meronem, Tienam
	c) Nocardicine	Nocardicină
	d) Monobactame	Aztreonam, Azactam

BCU "Iuliu Haţieganu" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 10.1 (continuare)

1	2	3
B. *Aminoglicozide*	1. Amikacină	Amikin, Amikozit, Orlobin
	2. Gentamicină	Gentamicin, Genticol, Lyramicin, Ophtagram
	3. Kanamicină	Kanamicină, Kanamicină sulfat
	4. Neomicină	Sulfat de neomicină
	5. Paromomicină	Paromomicină, Aminodisidină, Catenulină, Monomicină, Zigomicină.
	6. Spectinomicină	Spectinomicină, Kirin
	7. Streptomicină	Streptomicină sulfat
	8. Tobramicină	Brulamycin, Ikobel, Nebcin, Tobrex
C. *Polipeptide ciclice*	1. Colistină (Polimixină E)	Colistin, Colimycine
	2. Polimixină B	Sulfat de polimixină B
D. *Lactone macrociclice*	1. Macrolide	Eritro, Eritromagis, Eritromicină, Eriyfluid, Eryhexal, Erytro-Teva, Ilosone, Lactobionat de eritromicină
	2. Poliene ciclice	Nistatină, Nystatin
H. *Chinone*	1. Tetracicline de biosinteză	
	a) Oxitetraciclină	Oxitetraciclină
	b) Tetraciclină	Tetraciclină
	2. Tetracicline de semisinteză	
	a) Doxiciclină	Doxiciclină, Doxydar, Remicyn, Unidox Solutab, Vibramycin
	b) Rolitetraciclină	Solvocilin, Rolitetraciclin
	3. Rifampicine	Eremfat, R-Cin, Rifampicină, Sinerdol
I. *Nucleu aromatic*	1. Cloramfenicol	Cloramfenicol, Sificetină
	2. Griseofulvină	Griseofulvin

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 10.2

Principalele microorganisme utilizate pentru producerea antibioticelor la nivel industrial

Tip de microorganism	Tulpina producătoare	Denumire antibiotic
1	2	3
1. Fungi	*Penicillium chrysogenum* *Penicillium griseofulvum* *Cephalosporium acremonium*	Peniciline Griseofulvină Cefalosporina C
2. Actinomicete	*Streptomyces griseus* *Streptomyces kanamyceticus* *Streptomyces fradiae* *Streptomyces venezuelae* *Streptomyces aureofaciens* *Streptomyces rimosus* *Streptomyces erythreus* *Streptomyces mediterranei* *Streptomyces noursei*	Streptomicină Kanamicină Neomicină Cloramfenicol Tetraciclină Oxitetraciclină Eritromicină Rifampicină Nistatină
3.Bacterii formatoare de endospori	*Micromonospora purpurea* *Bacillus polymyxa* *Bacillus colistinus* *Bacillus licheniformis* *Norcardia uniformis*	Gentamicină Polimixină E Colistin (poliximină B) Bacitracină Nocardicină A

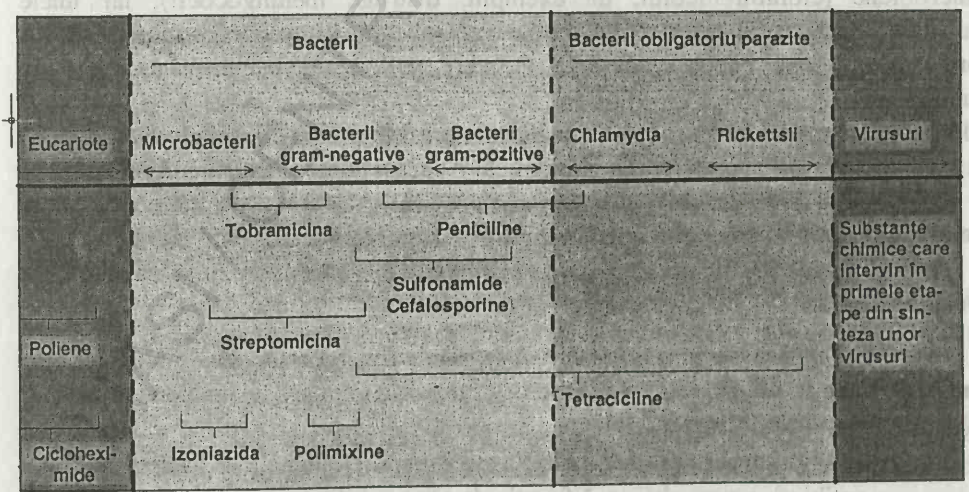


Fig. 10.1. Spectrul de activitate al unor antibiotice şi chimioterapice antimicrobiene de sinteză.

Antibioticele cu spectru îngust au totuşi avantajul de a controla microorganismele care, de obicei, nu răspund la alte antibiotice. Există antibiotice care au un spectru de acţiune extrem de îngust, fiind eficiente doar asupra unei singure sau cel mult câtorva specii bacteriene.

Spectrul inițial al activității antimicrobiene, așa cum a fost stabilit la introducerea fiecărui antibiotic în terapeutică, se poate îngusta cu timpul, datorită fenomenului de dezvoltare a rezistenței bacteriilor față de antibioticul respectiv.

d) ***Clasificarea antibioticelor în funcție de efectul acțiunii lor asupra populației bacteriene.*** Acțiunea antibioticelor asupra populației bacteriene poate produce două tipuri de efecte:

– *bacteriostatic*, efect reversibil, ce constă în inhibarea multiplicării germenilor, care ulterior sunt omorâți *in vivo*, prin intervenția mecanismelor de apărare ale organismului; reversibilitatea acestui efect se traduce prin faptul că după îndepărtarea antibioticului din mediul populației bacteriene, este posibilă reluarea procesului de înmulțire a germenilor. Antibioticele bacteriostatice tipice sunt tetraciclinele;

– *bactericid*, efect ireversibil, ce constă în distrugerea efectivă a germenilor prin lezarea integrității lor sau a funcțiilor celulare bacteriene. Efectul bactericid poate fi de două tipuri: *absolut*, care constă în distrugerea tuturor germenilor (atât în repaus, cât și în multiplicare), cum este cazul aminoglicozidelor sau al polimixinelor, sau *degenerativ*, care se manifestă ca urmare a acțiunii antibioticului mai ales asupra germenilor aflați în proliferare, cu metabolism activ, astfel acționând penicilinele și cefalosporinele.

Trebuie menționat faptul că cele două tipuri de efecte nu se pot diferenția în mod absolut. Este posibil ca tratamentul prelungit și/sau folosirea unor doze mari de substanță bacteriostatică să provoace distrugerea anumitor populații microbiene (cloramfenicolul, de exemplu, distruge meningococii), iar unele substanțe bactericide pot doar să inhibe multiplicarea anumitor germeni, fără a-i omorî (cum este cazul penicilinei G, care acționează bacteriostatic față de enterococi).

Parametrul farmacocinetic care descrie cel mai bine eficacitatea terapeutică a antibioticelor este concentrația plasmatică. Aceasta poate fi exprimată prin:

– *concentrația minimă inhibitorie* (CMI), care reprezintă concentrația minimă de antibiotic necesară pentru a inhiba creșterea microorganismului;

– *concentrația minimă bactericidă* (CMB), care reprezintă concentrația minimă de antibiotic ce omoară microorganismul.

e) ***Clasificarea antibioticelor după mecanismul de acțiune.*** Antibioticele antibacteriene pot fi grupate în funcție de structurile celulare microbiene la nivelul cărora își manifestă acțiunea în:

– antibiotice care produc inhibiția sintezei peretelui celular bacterian;

– antibiotice care alterează funcția de permeabilitate osmotică și selectivă a membranei citoplasmatice sau distrug membrana celulară bacteriană;

– antibiotice care inhibă biosinteza proteinelor bacteriene;

– antibiotice care inhibă sinteza acizilor nucleici.

Exemple de antibiotice care acționează conform mecanismelor menționate anterior sunt prezentate în figura 10.2.

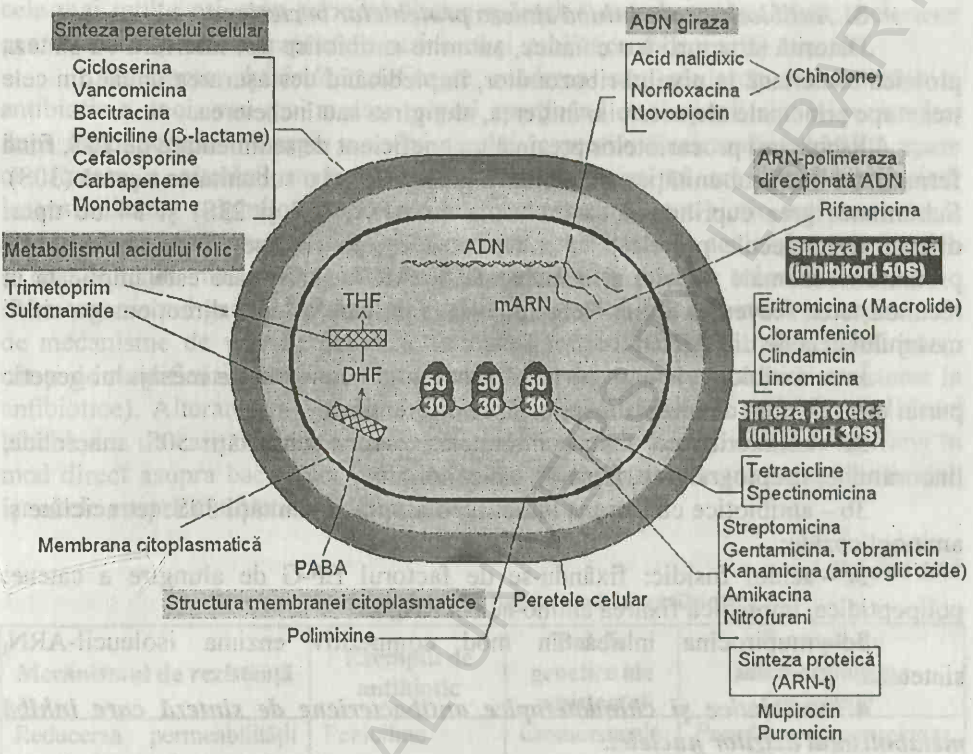


Fig. 10.2. Mecanismul de acțiune al principalelor antibiotice și al unor chimioterapice antibacteriene de sinteză.

Prin urmare, în funcție de mecanismul lor de acțiune, putem deosebi [Stroescu V., 2000]:

1. ***Antibiotice care inhibă sinteza peretelui celular bacterian prin:***

1a – inhibarea sintezei precursorilor peretelui celular bacterian: cicloserina, fosfomicina;

1b – inhibarea procesului de legare a precursorilor peretelui celular de molecule de lipide cu rol de cărăuși, care asigura transportul precursorilor prin membrana celulară: bacitracina;

1c – inhibarea procesului de inserare a unităților glicanice, precursoare ale peretelui celular și a transpeptidării: antibioticele ß-lactamice (intervin în sinteza peretelui celular prin inhibarea transpeptidării) și glicopeptidele, care se leagă de un intermediar din sinteza peretelui celular.

2. ***Antibiotice care acționează la nivelul membranei citoplasmatice:***

2a – polimixinele acționează ca detergenți cationici: datorită caracterului lor amfipatic, ele pătrund în celulă și se inserează printre fosfolipidele peretelui celular bacterian, perturbând astfel permeabilitatea membranei celulare;

2b – tirotricina și derivații săi.

3. ***Antibiotice care inhibă sinteza proteinelor bacteriene***

Datorită structurii lor chimice, anumite antibiotice pot interfera cu sinteza proteică bacteriană la nivelul ribozomilor, împiedicând desfăşurarea uneia din cele trei etape principale ale acesteia: iniţierea, alungirea sau încheierea.

Ribozomii procariotelor prezintă un coeficient de sedimentare de 70S, fiind formaţi din două subunităţi: o subunitatea grea (50S) şi o subunitatea uşoară (30S). Subunitatea grea cuprinde două molecule de ARNr (5S şi 23S) şi 34 de tipuri diferite de molecule proteice, iar subunitatea uşoară conţine 21 de molecule de proteine ribozomale diferite şi o moleculă de ARNr (16S) care este implicată în recunoaşterea secvenţei Shine-Delgarno, secvenţă care asigură direcţionarea citirii mesajului genetic din ARNm.

Între antibioticele care perturbă procesul de convertire a mesajului genetic purtat de ARNm în catena polipeptidică, se diferenţiază:

3a – antibiotice cu acţiune inhibitoare asupra subunităţii 50S: macrolide, lincosamide, streptogramine, fenicoli, oxazolidinone;

3b – antibiotice cu acţiune inhibitoare asupra subunităţii 30S: tetracicline şi aminoglicozide;

3c – acidul fusidic: fixându-se de factorul EF-G de alungire a catenei polipeptidice, împiedică fixarea amino-acil-ARN_t;

3d – mupirocina inhibă în mod competitiv enzima isoleucil-ARN_t sintetaza.

4. ***Antibiotice şi chimioterapice antibacteriene de sinteză care inhibă metabolismul acizilor nucleici:***

4a – inhibitori ai ARN polimerazei: ansamicinele;

4b – inhibitori ai ADN-girazei şi ai topoizomerazei IV: chinolone şi fluorochinolone;

4c – inhibitori ai sintezei acidului folic: sulfamide şi diaminopiridine.

5. ***Antibiotice care acţionează prin inhibiţie competitivă (antimetaboliţi):*** analogi ai vitaminelor (sulfamidele).

10.1.2. Rezistenţa la antibiotice

Eficienţa utilizării antibioticelor în tratamentul bolilor infecţioase este diminuată de faptul că microorganismele patogene au capacitatea de a-şi dezvolta mecanisme de apărare împotriva acestor agenţi chimioterapici. Există două tipuri de rezistenţă a bacteriilor la antibiotice şi anume: rezistenţa naturală şi rezistenţa dobândită. *Rezistenţa naturală* sau *insensibilitatea* la antibiotice defineşte capacitatea majorităţii sau a tuturor tulpinilor unei specii de a creşte şi a se înmulţi în prezenţa unor doze maxime de antibiotic, care sunt tolerate fără risc de organismul gazdă, doze care pot inhiba înmulţirea sau pot omorî alte specii. Exemple de astfel de specii insensibile la anumite antibiotice sunt: *P. aeruginosa,* rezistentă la tetraciclină şi ampicilină, *Proteus sp.*, rezistente la tetraciclină, *M. tuberculosis*, rezistentă la penicilină, cloramfenicol, tetraciclină, iar streptococii sunt rezistenţi la aminoglicozide. Rezistenţa naturală la antibiotic se explică, de

cele mai multe ori, prin permeabilitatea scăzută a membranei celulare bacteriene pentru acesta şi este o proprietate intrinsecă şi stabilă (cromozomală) a speciei.

Rezistenţa dobândită defineşte scăderea sau anularea sensibilităţii la antibiotic a uneia sau mai multor tulpini aparţinând unei specii natural rezistente, după introducerea în terapie a antibioticului respectiv. Rezistenţa dobândită apare ca urmare a alterării materialului genetic bacterian şi are drept consecinţă insensibilizarea tulpinilor respective la concentraţii de antibiotic mai mari decât acelea care inhibă creşterea tulpinilor parentale sensibile ale aceleaşi specii *in vitro* şi de asemenea mai mari decât cele corespunzătoare dozelor tolerate fără risc de către organismul gazdă. Dobândirea rezistenţei la antibiotice poate fi provocată atât de mecanisme de variaţie genetică endogenă (mutaţii cromozomale, translocări), cât şi de modificări genetice cu material exogen (transfer de plasmide rezistente la antibiotice). Alterarea materialului genetic bacterian induce o serie de modificări biochimice de care depinde rezistenţa la antibiotic: unele modificări se răsfrâng în mod direct asupra bacteriilor, pe care le fac insensibile la acţiunea antibioticului, iar altele asupra antibioticului, care devine inactiv.

Tabelul 10.3

Mecanisme de rezistenţă bacteriană la antibiotice

Mecanismul de rezistenţă	Exemplu de antibiotic	Bazele genetice ale rezistenţei	Exemple de microorganisme rezistente
Reducerea permeabilităţii învelişului celular bacterian	Peniciline	Cromozomală	*Pseudomonas aeruginosa* Bacterii enterice
Eflux	Tetracicline	Plasmidială	Bacterii enterice
Inactivarea enzimatică a antibioticului (de ex.: penicilinaza şi alte enzime care modifică structura antibioticelor)	Peniciline	Plasmidială şi cromozomală	*Neisseria gonorrheae* *Staphylococcus aureus* Bacterii enterice
	Cloramfenicol	Plasmidială şi cromozomală	*Staphylococcus aureus* Bacterii enterice
	Aminoglicozide	Plasmidială	*Staphylococcus aureus*
Alterarea ţintei specifice (de ex.: ARN-polimerază, ribozomi şi altele)	Eritromicină Rifampicină Streptomicină Norfloxacina*	Cromozomală	*Staphylococcus aureus* Bacterii enterice Bacterii enterice Bacterii enterice *Staphylococcus aureus*
Dezvoltarea unei căi metabolice de rezistenţă	Sulfonamide*	Cromozomală	*Staphylococcus aureus* Bacterii enterice

* Chimioterapice antibacteriene de sinteză.

În rezumat, cauzele care pot împiedica exercitarea acţiunii antibioticului asupra ţintei celulare specifice sunt următoarele [Davies J., 1996]:

– eliminarea sau modificarea ţintei specifice de acţiune a unui anumit antibiotic (de exemplu alterarea proteinelor specifice de pe subunităţile ribozomale 30 S sau 50 S);

– permeabilitatea redusă a membranei citoplasmatice față de un anumit antibiotic;

– producerea de enzime care provoacă alterarea structurii antibioticului la o formă inactivă;

– modificarea sistemelor de transport activ al antibioticului prin membrana celulară bacteriană (în sensul diminuării influxului în favoarea efluxului);

– apariția unei căi metabolice alternative care șuntează calea metabolică țintă a antibioticului.

10.1.3. Producerea antibioticelor la scară industrială

Antibioticele sunt produse ale metabolismului microbian secundar, a căror biosinteză începe o dată cu instalarea fazei staționare din dezvoltarea biomasei și se desăvârșește pe parcursul acesteia, spre deosebire de metaboliții primari, care se formează în timpul fazei majore de creștere logaritmică a masei celulare.

Pentru a fi utilizate la nivel industrial, microorganismele producătoare de antibiotice trebuie să aibă o serie de calități, printre care se numără:

– capacitatea de a se dezvolta relativ rapid la scară mare și, de preferință, pe medii de cultură conținând componente accesibile ca preț;

– proprietatea de a fi relativ ușor modificabile genetic, cu scopul măririi potențialului lor bioproductiv;

– lipsa patogenității și a metaboliților toxici.

Biosinteza antibioticelor la nivel industrial se realizează în cadrul unor procese de fermentație aerobă, în instalații special destinate acestui scop. Acestea sunt alcătuite de regulă din două zone (hale) distincte și anume: zona de fermentație și zona de prelucrare post-biosinteză. În zona de fermentație se află bioreactoarele, dispuse de obicei în trepte crescătoare ca volum al utilajelor (inoculator, intermediar, regim), în care se desfășoară procesele de fermentație propriu-zisă. Acestea sunt dotate cu un echipament complex, necesar pentru asigurarea unei agitări și aerări adecvate a mediului de fermentație, precum și pentru controlul și reglarea tuturor factorilor care influențează bioprocesul. Fermentațiile sunt monitorizate pe toată durata desfășurării lor, nu numai în ceea ce privește cantitatea de biomasă sau de produs formată, ci și în ceea ce privește parametrii caracteristici: concentrația de oxigen, *p*H, temperatură, grad de spumare etc. Controlul proceselor industriale de fermentație se realizează la ora actuală cu ajutorul calculatoarelor. Acestea au o importanță deosebită pentru că permit achiziția de date care reflectă modificările ce au loc în timpul procesului, precum și controlul și reglarea parametrilor, la valori optime, corespunzătoare scopului urmărit.

Elementele constructive și de exploatare ale fermentatoarelor, etapele tehnologice preliminare fazei de fermentație (pregătirea și sterilizarea mediilor de cultură și a instalației), precum și procedeele de monitorizare și reglare a parametrilor bioprocesului sunt comune tuturor proceselor industriale de biosinteză microbiană care folosesc același tip de bioreactoare.

În zona de prelucrare post-biosinteză se află utilajele necesare pentru separarea şi purificarea produsului principal de biosinteză: filtre, centrifugi, concentratoare, extractoare, coloane cromatografice, vase de cristalizare, pompe de vid etc.

Eficienţa tehnologiilor de obţinere a antibioticelor este în mare măsură determinată de utilizarea unor procedee adecvate de izolare a acestora din mediile de fermentaţie, medii în care există alţi numeroşi produşi de biosinteză (între care unii cu structură foarte asemănătoare) sau de degradare a masei celulare. Prelucrarea post-biosinteză a mediilor de fermentaţie (fig. 10.3) cuprinde o serie de etape de purificare în trepte şi de izolare finală a antibioticului în stare cristalină, etape care se realizează pe baza unor procedee care diferă de la un antibiotic la altul şi/sau de la o tehnologie la alta [Weinstein M.J., 1978].

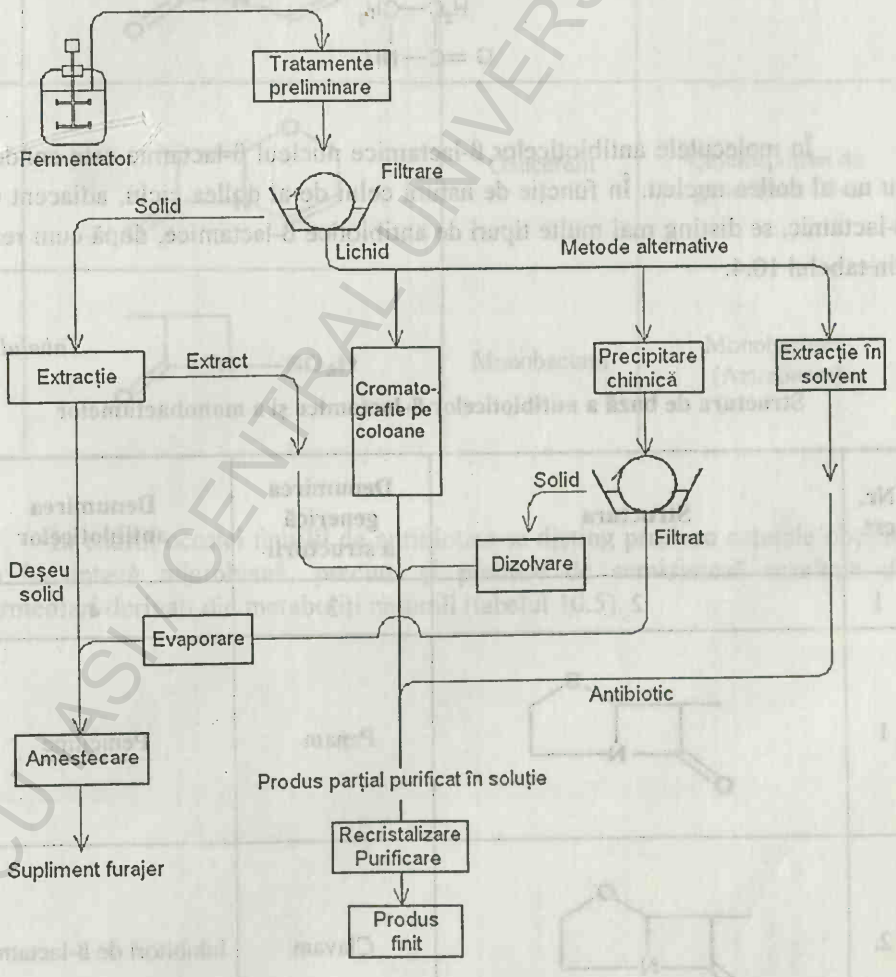


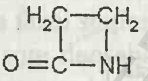
Fig. 10.3. Schema de principiu a izolării şi purificării unui antibiotic.

BCU "Ion Creangă" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

10.2. ANTIBIOTICE β -LACTAMICE

Antibioticele β-lactamice formează una din cele mai importante familii de antibiotice, atât din punct de vedere al eficacității terapeutice, cât și din punct de vedere al pieței produselor farmaceutice, reprezentând, la nivel mondial, mai mult de 60% din valoarea totală a antibioticelor comercializate. Cele mai cunoscute și utilizate antibiotice din această familie sunt penicilinele și cefalosporinele.

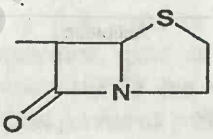
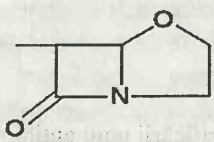
Denumirea de antibiotice β-lactamice se datorează elementului structural comun, reprezentat de un heterociclu β-lactamic, format din 4 atomi.



În moleculele antibioticelor ß-lactamice nucleul ß-lactamic este condensat cu un al doilea nucleu. În funcție de natura celui de-al doilea ciclu, adiacent celui ß-lactamic, se disting mai multe tipuri de antibiotice ß-lactamice, după cum rezultă din tabelul 10.4:

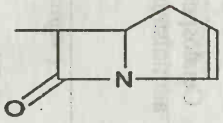
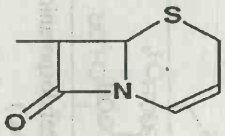
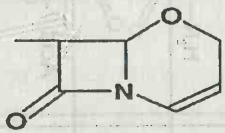
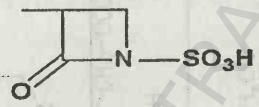
Tabelul 10.4

Structura de bază a antibioticelor ß-lactamice și a monobactamelor

Nr. crt.	Structura	Denumirea generică a structurii	Denumirea antibioticelor
1	2	3	4
1.		Penam	Peniciline
2.		Clavam	Inhibitori de ß-lactamaze

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 10.4 (continuare)

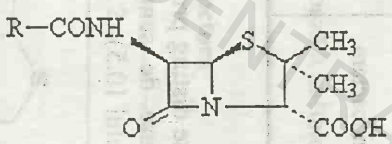
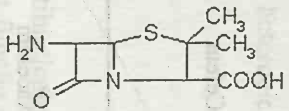
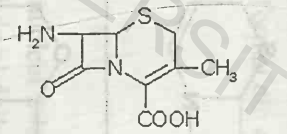
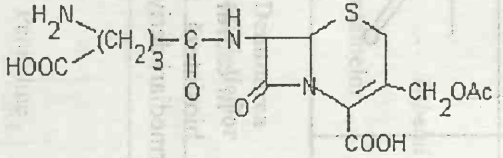
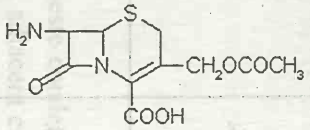
1	2	3	4
3.		Carbapenem	Imipenem şi derivaţi
4.		Cefem	Cefalosporine
5.		Oxacefem	Cefalosporine de generaţia a III-a
6.		Monobactam	Monobactame (Aztreonam)

În cadrul acestei familii de antibiotice se disting produse naturale obţinute prin biosinteză microbiană, precum şi produse de semisinteză rezultate din intermediari derivaţi din metaboliţi naturali (tabelul 10.5).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

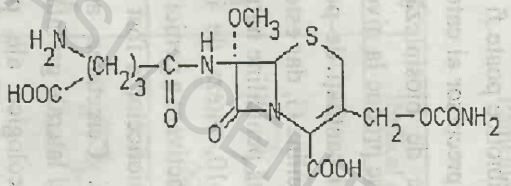
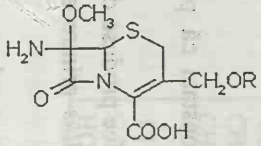
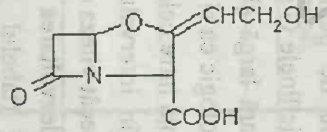
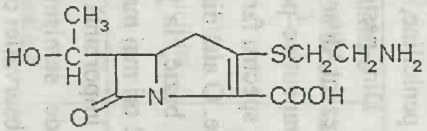
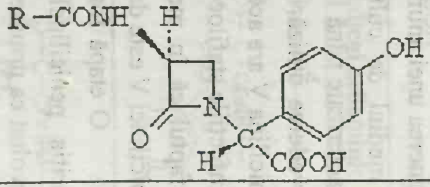
Tabelul 10.5

Antibiotice β-lactamice

Microorganism producător	Antibiotic natural	Intermediar cheie	Antibiotic semisintetic
1	2	3	4
Penicillium chrysogenum	Peniciline G şi V  R = $C_6H_5CH_2CO$- (Penicilina G) $C_6H_5OCH_2CO$- (Penicilina V)	Acid 6-aminopenicilanic (6 AP) 	Peniciline
Cephalosporium sp.	–	Acid 7-aminodesacetoxicefalosporanic (7-ADC) 	Cefalosporine cu administrare orală
	Cefalosporină C 	Acid 7-aminocefalosporanic (7 AC) 	Cefalosporine cu administrare parenterală

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

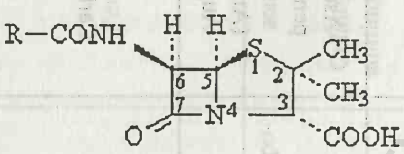
Tabelul 10.5 (continuare)

1	2	3	4
Cephalosporium sp.	Cefamicină 	Acid 7-aminometoxicefalosporanic (7-AMC) 	Cefamicine
Streptomyces sp.	Acid clavulanic 	–	Asociații cu peniciline de semisinteză (Amoxiclav, Augmentin)
	Tienamicină 	–	Carbapeneme
Norcardia sp.	Nocardicină 	–	Nocardicine

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

10.2.1. Peniciline

Structura de bază a penicilinelor este reprezentată de un sistem biciclic condensat, tiazolidin-β-lactamic, cunoscut sub denumirea de penam.



Pornind de la această structură, se poate constata că penicilinele sunt derivaţi acilaţi ai acidului 6-aminopenicilanic.

Penicilinele de biosinteză sunt substanţe chimice produse de diferite specii de microorganisme din genul *Penicillium* şi *Aspergillus* printre care: *P. chrysogenum*, *P. notatum*, *A. niger* etc.

Microorganismele sus-menţionate au proprietatea de a produce în mod natural mai multe tipuri de peniciline, care diferă între ele prin natura radicalului acil (tabelul 10.6). Procesul de biosinteză a acestor antibiotice poate fi dirijat către obţinerea unei anumite peniciline, prin adăugarea unui precursor al catenei laterale în mediul de cultură. Din peste 100 de peniciline de biosinteză izolate şi caracterizate până în prezent, doar penicilinele G şi V se produc la nivel industrial în vederea utilizării terapeutice pe scară largă şi mici cantităţi de penicilină O. Penicilina V are acelaşi spectru farmacologic ca şi penicilina G, dar este mai activă în infecţiile stafilococice. O altă diferenţă între cele două peniciline naturale constă în faptul că în mediu bazic, la *p*H în intervalul 9–10, viteza de inactivare a penicilinei V este de 2,2 ori mai mare decât viteza de inactivare a penicilinei G.

O etapă foarte importantă în dezvoltarea antibioticelor a fost marcată de apariţia penicilinelor de semisinteză (tabelul 10.7). Cercetarea acestora s-a dezvoltat ca urmare a observaţiei că modificarea catenei laterale grefată pe nucleul penam influenţează proprietăţile chimice şi farmacologice ale penicilinelor (stabilitatea în mediu acid, spectrul de acţiune, proprietăţile farmacocinetice) şi din necesitatea de a reduce sau elimina dezavantajele penicilinelor naturale: rezistenţa dobândită de bacterii, activitatea scăzută asupra germenilor Gram-negativi, instabilitatea în mediu acid şi sensibilitatea faţă de acţiunea penicilinazei. Astfel, s-a pus problema obţinerii unor peniciline cu proprietăţi superioare celor de biosinteză, prin introducerea unor noi catene laterale în structura acidul 6-AP.

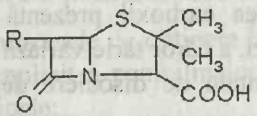
Tabelul 10.6

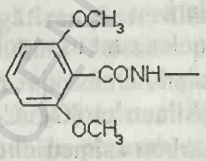
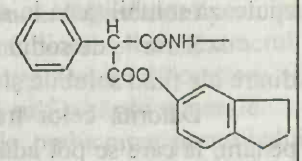
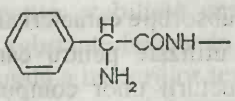
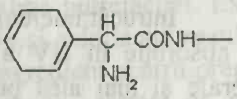
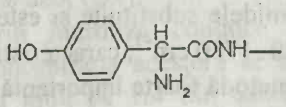
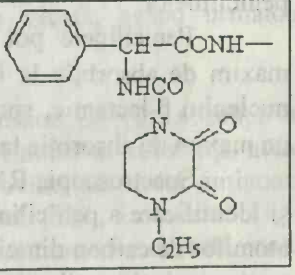
Structura unor peniciline naturale

Denumirea penicilinei	R (catena laterală)	
	Structură	Denumire
Penicilina F	$CH_3 - CH_2 - CH = CH - CH_2$	2-pentenil
Penicilina dihidro F	$CH_3 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2$	2-pentil
Penicilina G	$C_6H_5 - CH_2$	benzil
Penicilina K	$CH_3 - (CH_2)_5 - CH_2$	n-heptil
Penicilina N	$^+NH_3 - CH(COO^-) - (CH_2)_3 -$	D(-)4-amino-4-carboxi-butil
Penicilina O	$CH_2 = CH - CH_2 - S - CH_2$	alilmercaptometil
Penicilina S	$CH_3 - C(Cl) = CH - CH_2 - S - CH_2$	3-Clor-2-buteniltiometil
Penicilina V	$C_6H_5 - O - CH_2 -$	fenoximetil
Penicilina X	$HO - C_6H_5 - CH_2 -$	p-hidroxibenzil

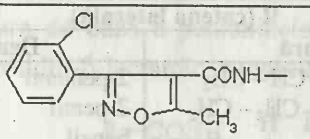
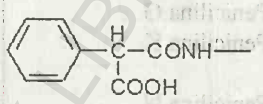
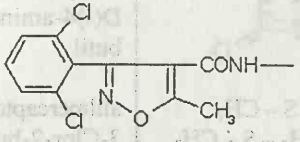
Tabelul 10.7

Peniciline de semisinteză



Denumire generică	Radical acilaminic	Denumire generică	Radical acilaminic
1	2	3	4
Meticilină		Indanilcarbenicilină	
Ampicilină		Epicilină	
Amoxicilină		Piperacilină	

Tabelul 10.7 (continuare)

1	2	3	4
Cloxacilină		Carbenicilină	
Dicloxa-cilină			

10.2.1.1. Proprietățile penicilinelor

a) Proprietăți fizico-chimice

Penicilinele sunt substanțe albe, cristaline. În general, nu au puncte de topire nete, descompunându-se în timpul încălzirii.

Gruparea carboxil prezentă în structura penicilinelor conferă acestora caracter de acizi, a căror tărie variază în funcție de substituenții existenți pe nucleul penam, constantele de disociere depinzând de solventul în care se efectuează determinarea.

În formă acidă, sunt solubile în solvenți organici, proprietate pe care se bazează izolarea și purificarea penicilinelor prin extracție lichid-lichid; prezența unei alte grupări polare în moleculă, în special a unei grupe amină, reduce sau anulează solubilitatea în solvenți organici nepolari.

Sărurile de sodiu și potasiu ale penicilinelor sunt ușor solubile în apă, unele dintre ele fiind solubile și în anumiți solvenți polari.

Datorită celor trei atomi de carbon asimetrici (C_3, C_5, C_6) din nucleul penam, la care se pot adăuga și alți atomi de carbon asimetrici din catena laterală, penicilinele sunt substanțe optic active.

Întrucât nucleul penam nu prezintă absorbție caracteristică în UV, spectrele de absorbție în UV a penicilinelor sunt utilizate pentru caracterizarea catenei laterale și mai ales pentru elucidarea structurii unor compuși de degradare ai penicilinelor.

Penicilinele pot fi caracterizate prin spectrul IR deoarece prezintă un maxim de absorbție la frecvențe cuprinse între 1760 și 1800 cm^{-1}, caracteristic nucleului β-lactamic, spre deosebire de amidele substituite și esteri, care prezintă un maxim de absorbție la frecvența de 1720–1780 cm^{-1}, caracteristic grupei C=O.

Spectroscopia RMN reprezintă o metodă foarte importantă de caracterizare și identificare a penicilinelor, întrucât semnalele care provin de la protonii atașați atomilor de carbon din ciclul β-lactamic oferă informații despre integritatea acestui nucleu, substituenții existenți și poziția lor sterică.

Din punct de vedere chimic, penicilinele se caracterizează prin faptul că sunt forte sensibile la atacul agenților oxidanți, precum și al reactanților nucleofili (ioni hidroxil, alchilamine, hidroxilamină, alcooli etc.) și electrofili (compuși donori de protoni), ceea ce explică instabilitatea lor în mediu alcalin sau acid.

b) Proprietăți biologice

Penicilinele își exercită acțiunea asupra bacteriilor prin inhibarea sintezei peptidoglicanilor specifici structurii peretelui celular bacterian. Este cunoscut faptul că peretele celular bacterian, care are rolul de a menține integritatea celulei, apărând-o de efectele presiunii osmotice din apă sau fluidele organismelor gazdă, are o structură spațială rigidă. Aceasta se datorează macromoleculelor complexe formate din fibre de glican (unități de N-acetil-glucozamină și acid N-acetil muramic), legate între ele prin punți peptidice. Aceste punți se formează în urma unei reacții de transpeptidare, catalizată de enzime care sunt inactivate ireversibil de antibioticele β-lactamice. Datorită faptului că această reacție este caracteristică numai bacteriilor, antibioticele β-lactamice au o specificitate ridicată și o toxicitate relativ scăzută.

10.2.1.2. Tehnologia de obținere a penicilinelor de biosinteză

Din punct de vedere tehnologic, procesele de obținere la nivel industrial a produselor de biosinteză microbiană și implicit a penicilinelor, se caracterizează prin următoarea succesiune de etape principale:

- pregătirea mediilor de cultură (preparare și sterilizare);
- fermentația propriu-zisă;
- izolarea și purificarea antibioticului.

a) Pregătirea și sterilizarea mediilor de cultură. Ingredientul principal al mediilor de cultură folosite pentru biosinteza penicilinelor este extractul de porumb, acesta reprezentând principala sursă de azot și factori de creștere și, în același timp, o sursă foarte echilibrată de carbon, azot, sulf și săruri minerale.

Extractul de porumb este un subprodus de la prelucrarea porumbului în scopul obținerii amidonului și a glucozei. Porumbul se tratează cu soluție diluată de dioxid de sulf pentru stabilirea unui *p*H acid și prevenirea putrefacției. Extractul obținut conține substanțe bogate în azot, săruri minerale și acid lactic rezultat din fermentația naturală a bacteriilor termofile lactice. Ca ingredient pentru prepararea mediilor de cultivare a microorganismelor se folosește un extract de porumb concentrat până la un conținut de 50% substanță uscată, având următoarea compoziție:

- 4% azot (g/v);
- prin hidroliză conduce la următorii aminoacizi (în absența altei mențiuni, concentrația acestora se raportează la conținutul în substanță uscată): alanină (mai mult de 1/4 din cantitatea de azot provine din acest aminoacid), arginină și acid glutamic (8%), leucină (6%), prolină (5%), izoleucină (3,5%), treonină (3,5%), valină (3,5%), fenilalanină (2,0%) și aminoacizi cu sulf, inclusiv metionină (1%) și cistină (1%);

– carbon, prezent atât în aminoacizi cât şi în acid lactic, complexe poliglucidice şi cantităţi mici şi variabile de glucide reducătoare;

– 1% calciu, 2,5% fosfor, 1,5% potasiu, raportate la substanţa uscată;

– riboflavină, niacină, acid pantotenic, biotină şi piridoxină.

Caracterul acid al extractului de porumb impune introducerea în mediile de fermentaţie a până la 1% g/v carbonat de calciu, pentru a asigura un *p*H adecvat proceselor de biosinteză.

Ca surse de carbon şi energie se folosesc glucoza şi lactoza. Comparativ cu glucoza, lactoza nu este metabolizată la fel de rapid, dar are avantajul de a nu produce represie de catabolit. De aceea, este necesar a se asigura un raport adecvat între conţinutul mediului în glucoză, utilizată în special ca sursă de energie pentru creşterea masei celulare şi lactoză, care este utilizată ca sursă de energie pentru elaborarea penicilinelor.

Prezenţa substanţelor minerale (săruri de potasiu, magneziu, fosfor, fier şi sulf) este absolut necesară atât în procesul de creştere a masei celulare, cât şi pentru biosinteza penicilinelor, întrucât ele intervin în reglarea permeabilităţii membranei celulare, a echilibrului ionic şi în activarea sistemelor enzimatice implicate în bioproces (de exemplu, KH_2PO_4, furnizează K^+ ca activator enzimatic şi PO_4^{-3} pentru fosforilare şi formarea moleculelor macroergice de tip ATP şi ADP).

Pentru dirijarea procesului de biosinteză spre o anume penicilină, este necesară introducerea, în compoziţia mediilor de cultură, a unor *precursori* ai catenei laterale. Precursorii se adaugă în porţiuni, astfel încât concentraţia acestora să nu depăşească 0,1–0,2 %, deoarece la concentraţii mai mari sunt toxici pentru microorganismul producător.

Pentru penicilina G se utilizează ca precursor acidul fenilacetic, iar pentru penicilina V, acidul fenoxiacetic.

La nivel industrial, instalaţiile destinate obţinerii penicilinelor sunt prevăzute cu vase speciale pentru pregătirea mediilor de cultură, utilate cu agitatoare, conducte pentru abur viu, serpentine de încălzire-răcire. În aceste vase se introduce mai întâi apa, care se încălzeşte la 60–70°C şi apoi se adaugă extractul de porumb, amestecul rezultat menţinându-se la fierbere timp de aproximativ o oră. Restul componenţilor de mediu se adaugă după răcirea soluţiei de extract de porumb la 50–60°C, în următoarea ordine: $CaCO_3$, săruri minerale, lactoză, glucoză.

Având în vedere faptul că sterilizarea mediului de cultură se face cu abur direct ce condensează în timpul sterilizării furnizând o cantitate suplimentară de apă, aceasta trebuie luată în calcul pentru respectarea concentraţiilor din reţeta de mediu.

Mediile astfel preparate se pot steriliza direct în fermentator sau, în cazul volumelor mari, în instalaţia de sterilizare continuă, la 124–126°C timp de 10–12 minute sau la 140–145°C timp de câteva secunde, timpul de răcire variind în funcţie de temperatura şi tipul de sterilizare. După răcire la 30°C, mediile astfel sterilizate pot fi inoculate.

b) Fermentaţia. Penicilinele, ca de altfel majoritatea antibioticelor, sunt produse ale metabolismului secundar. În timpul fazei de creştere a biomasei se

produce o cantitate foarte redusă de penicilină, dar odată cu consumarea sursei de carbon începe faza de biosinteză a antibioticului. Prin suplimentarea cu nutrienți a mediului de cultură faza de producție poate fi prelungită în timp.

La nivel industrial, penicilinele naturale se obțin printr-un proces aerob de fermentație submersă, cu ajutorul unor tulpini mutante de *Penicillium chrysogenum*, caracterizate printr-o capacitate bioproductivă ridicată, obținute prin modificări genetice.

Fermentația se realizează în trei trepte – inoculator, intermediar și regim – care se diferențiază, din punct de vedere biologic, prin stadiul de dezvoltare al microorganismului și din punct de vedere tehnologic prin volumul mediului de fermentație, cu toate consecințele care decurg din acestea (parametrii de bioproces diferiți de la o treaptă la alta). În inoculator se realizează aclimatizarea microorganismului la noile condiții de dezvoltare, în intermediar are loc acumularea de masă celulară, iar în regim se desăvârșește procesul de creștere a masei celulare și de biosinteză a penicilinei.

În realitate, procesul evoluează fără a exista o distincție foarte netă între treapta a doua (intermediar) și a treia (regim), deoarece distribuția neuniformă a vârstei microorganismului face ca elaborarea de penicilină să poate începe din intermediar.

Pe lângă potențialul bioproductiv al microorganismului și echilibrarea judicioasă a compoziției mediului de cultură, eficacitatea procesului de biosinteză este determinată de menținerea sterilității în timpul procesului, de asigurarea necesarului de oxigen și de menținerea temperaturii și a *p*H-ului la valori optime, corespunzătoare fazei metabolice în care se află microorganismul.

Asigurarea sterilității se realizează prin aplicarea unei suprapresiuni de 1,2–1,3 ata creată prin barbotare de aer steril.

Cerințele de oxigen sunt maxime în faza de creștere, care se caracterizează prin utilizarea intensivă a componentelor mediului de cultură pentru acumularea de masă micelian și prin activitate respiratorie intensă, concretizată prin degajare de CO_2.

În faza de producere a penicilinei, caracterizată prin încetinirea creșterii miceliului ca urmare a epuizării constituenților ușor asimilabili din mediu, necesarul de oxigen scade.

În ceea ce privește *p*H-ul, valorile optime ale acestuia diferă în faza de creștere a masei celulare (4,5–5) față de cea de producere a antibioticului (7,0–7,5). Creșterea *p*H-ului peste valoarea 7,5 către 8 se datorează eliberării de amoniac în mediu și constituie un semnal al începerii procesului de autoliză și un factor de degradare a penicilinelor, instabile în mediu alcalin.

Valorile optime de temperatură variază de asemenea, de la 30°C în faza de creștere a masei celulare, la 24°C în faza de biosinteză a penicilinei. Întrucât cele două faze sunt greu de separat practic, procesul de fermentație este condus la temperatura de 26±1°C, care reprezintă o valoare de compromis.

Fermentația durează 120–125 h și se consideră terminată atunci când conținutul de zahăr scade la 0,2–0,6 %, concentrația de penicilină putând atinge un maxim de 3%.

Evoluția unui proces eficient de fermentație a penicilinelor este prezentată în figura 10.4 [Jurcoane, Șt., 2000].

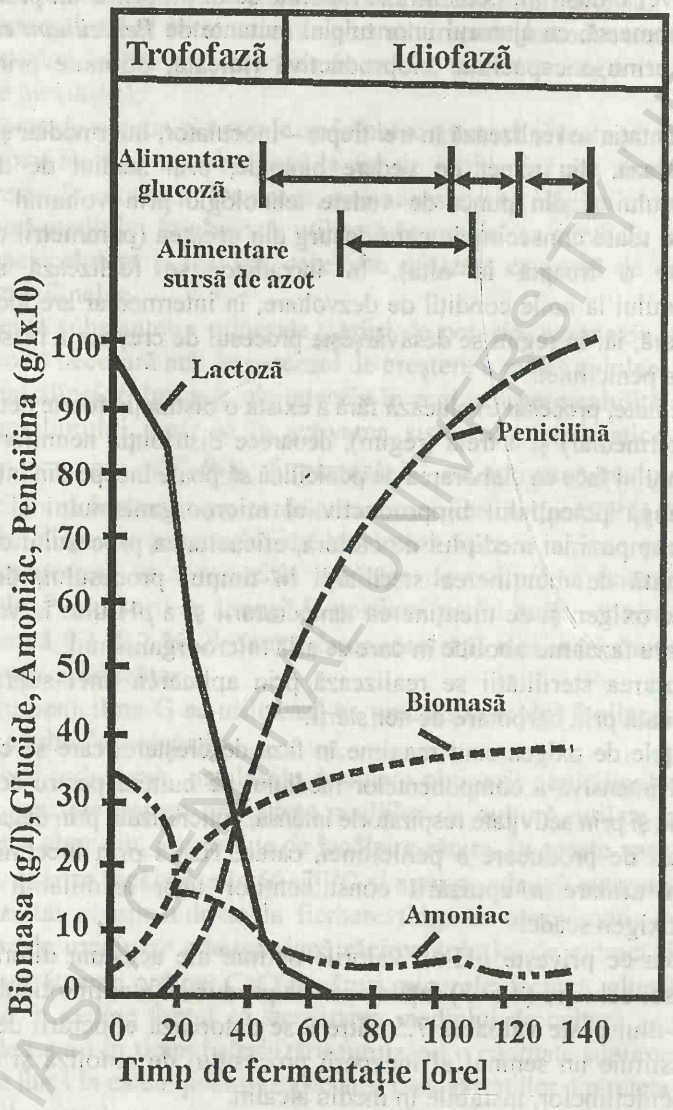


Fig. 10.4. Evoluția în timp a fermentației cu *Penicillium chrysogenum*.

Această evoluție corespunde menținerii parametrilor bioprocesului la valorile prezentate în tabelul 10.8 [Oniscu C., 1988].

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 10.8

Parametrii procesului de fermentaţie a penicilinei

Etapa de fermentaţie	Temperatură [°C]	Agitare [rpm]	Debit aer [l/l mediu/min]	Presiune [ata]	Durată proces [h]
Inoculator	26±1°C	270	1,0	1,2–1,3	30–40
Intermediar	26±1°C	170	1,0–1,2	1,2–1,3	20–40
Regim	26±1°C	120	0,6–1,0	1,2–1,3	90–120

Din examinarea datelor cuprinse în tabelul 10.8 se poate constata că asigurarea necesarului de oxigen adecvat fiecărei faze metabolice şi dizolvarea cu viteză corespunzătoare a oxigenului introdus se realizează prin corelarea debitului de aer cu viteza de agitare. Stabilirea regimului de agitare în funcţie de acumularea biomasei (creşterea vâscozităţii) contribuie la asigurarea condiţiilor optime necesare desfăşurării procesului de fermentaţie.

c) Izolarea şi purificarea penicilinelor de biosinteză. În procesul de izolare–purificare a penicilinelor trebuie să se ţină seama de compoziţia complexă a mediului de fermentaţie. Acesta conţine, pe lângă antibioticul urmărit ca produs principal de biosinteză (care se găseşte în concentraţii mai mici de 3%), alte substanţe cu structuri şi proprietăţi asemănătoare (produşi de degradare sau metaboliţi precursori ai penicilinelor), precum şi alte produse biologice (proteine, acizi nucleici, polizaharide, vitamine etc.) şi săruri minerale.

Pentru izolarea penicilinelor din mediul nativ complex, se foloseşte metoda extracţiei lichid–lichid, care se bazează pe diferenţele de solubilitate, caracteristici ionice şi stabilitate chimică, existente în anumite condiţii între substanţele prezente în mediu, în finalul biosintezei.

Deoarece penicilinele sunt produse extracelulare, prima treaptă de prelucrare a mediului de fermentaţie, în scopul izolării acestora, constă în separarea miceliului. Această operaţie se realizează prin filtrare cu ajutorul unor utilaje adecvate (de obicei filtre tambur sau filtre rotative).

Din filtratul rezultat, penicilina se separă prin extracţie cu solvenţi organici. Eficienţa acestui procedeu depinde de natura solventului (respectiv de selectivitatea acestuia faţă de penicilina existentă în amestec cu alţi produşi), precum şi de asigurarea următoarelor condiţii:

– mediu puternic acid în care penicilina se află exclusiv în forma sa acidă, formă în care este solubilă în solvenţi organici;

– eliminarea posibilităţii de asociere intermoleculară a penicilinei în forma acidă;

– eliminarea posibilităţii de disociere a moleculei de penicilină.

Dintre solvenţii organici utilizabili pentru extracţia penicilinelor (esteri, cetone, cicloalcani substituiţi), cel mai des se întrebuinţează acetatul de butil, care corespunde condiţiilor de mai sus şi în plus este şi accesibil din punct de vedere economic.

Un exemplu de astfel de procedeu, aplicat la nivel industrial în cazul penicilinei G, este cel în care se succed mai multe trepte de extracție, după cum urmează:

– în prima treaptă are loc trecerea antibioticului din soluția apoasă (mediu de fermentație filtrat și acidulat cu acid sulfuric 4–5 % la *p*H = 2–2,5) în soluția de acetat de butil, folosind un raport volumetric între soluția apoasă și acetat de butil de 3:1; datorită instabilității penicilinelor în mediu acid, este necesar ca extracția să se efectueze cât mai rapid, motiv pentru care se folosesc extractoare centrifugale în contracurent, care realizează amestecarea și separarea într-o singură fază.

– în treapta a doua de extracție penicilina este trecută din faza organică (acetat de butil) într-o soluție apoasă de fosfat monosodic (4%) la *p*H = 7–7,2 folosind un raport volumetric între acetatul de butil și soluția apoasă de 3:1.

– în treapta a treia penicilina se extrage din nou în acetat de butil, în condițiile aplicate în treapta întâi, obținându-se în final o soluție de penicilină în acetat de butil cu concentrație de 80 000–90 000 UI/ml.

În continuare, soluția finală de penicilină în acetat de butil se anhidrizează astfel: se răcește la –10...–12°C, temperatură la care îngheață apa dizolvată în acetatul de butil, iar cristalele se filtrează pe filtru de presiune. Soluția deshidratată de penicilină în acetat de butil, rezultată după filtrare, se tratează cu o soluție alcoolică de acetat de sodiu sau potasiu, când penicilina precipită sub formă de sare. Aceasta se filtrează și apoi se spală prin amestecare cu butanol, sub agitare. După spălare, penicilina sare se filtrează și se spală pe filtru cu cloroform, pentru îndepărtarea butanolului. Penicilina G se usucă la 50...60 °C, în strat fluidizat.

Penicilina V se obține printr-o tehnologie asemănătoare penicilinei G, cu deosebirea că extracția se realizează în două trepte. Acest lucru este posibil deoarece penicilina V prezintă în forma acidă o solubilitate foarte scăzută în apă, astfel încât după treapta a doua de extracție în apă, aceasta precipită prin acidulare cu acid sulfuric diluat. Penicilina V astfel separată se filtrează, se purifică din solvenți și se usucă la 35...40 °C, sub vid.

Un alt procedeu de izolare a penicilinelor se bazează pe același principiu al extracției lichid–lichid, care se realizează însă într-o singură treaptă, urmată de separarea și purificarea penicilinei sub formă de sare.

Conform acestui procedeu, penicilina este extrasă în acetat de butil din soluția nativă, după îndepărtarea micelului, iar extractul organic se tratează cu acetat de potasiu sau carbonat de potasiu, când precipită penicilina sare. Produsul obținut se filtrează și se spală cu butanol și cloroform. Solvenții se recirculă, iar penicilina sare se dizolvă în apă, se purifică cu cărbune activ, după care se izolează prin distilarea apei sub formă de azeotrop cu butanol, la vid (4–6 mm Hg). Astfel se obține un produs solid cu activitate și puritate corespunzătoare utilizării farmaceutice.

Scăderea consumului specific de butanol, impusă din considerente economice, se poate realiza prin recuperarea acestuia din amestecurile cu acetat de butil și/sau apă, prin distilare fracționată pe coloane special destinate acestui scop.

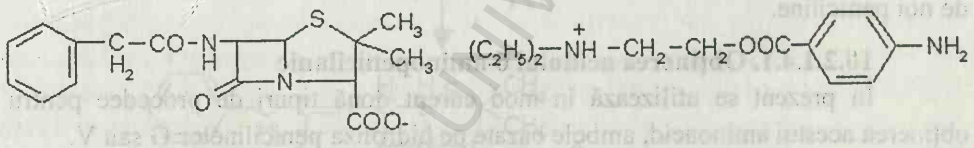
10.2.1.3. Peniciline retard

Penicilinele retard sunt săruri insolubile în apă ale penicilinei G, cu remanență mare în organism, care asigură, printr-o singură doză administrată, o concentrație terapeutică utilă pentru 7–14 zile.

Fiind insolubile în apă, penicilinele retard se administrează injectabil, sub formă de suspensii. Acest fapt impune ca procesul de cristalizare să fie dirijat spre obținerea unor cristale foarte fine, cu o distribuție uniformă a dimensiunilor între 40–60 μ. Din punct de vedere tehnologic, astfel de microcristale se pot obține prin agitare energică cu jet de aer sub presiune sau prin recristalizare din anumiți solvenți, la anumite temperaturi.

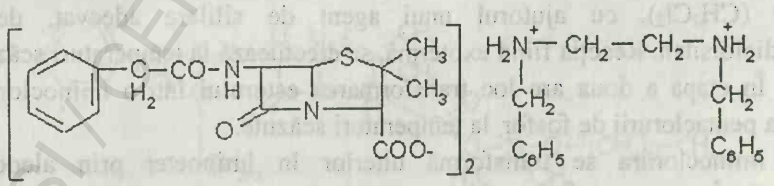
Cele mai importante peniciline retard sunt: procainpenicilina, benzatinpenicilina și clemizolpenicilina.

Procainpenicilina G (*Efitard*, *Fortepen*) se obține din soluție apoasă, sub formă de cristalohidrat cu o moleculă de apă, prin tratarea penicilinei G, sub formă de sare de potasiu, etil-piperidină, ciclohexilamină sau trietilamină, cu clorhidrat de procaină.



Procainpenicilina G se administrează sub formă de soluții injectabile, având un timp de acțiune de 12–24 ore. Asociată cu penicilina G, se folosește în tratamente care au un efect de șoc, datorat penicilinei solubile și de durată, datorat procainpenicilinei G.

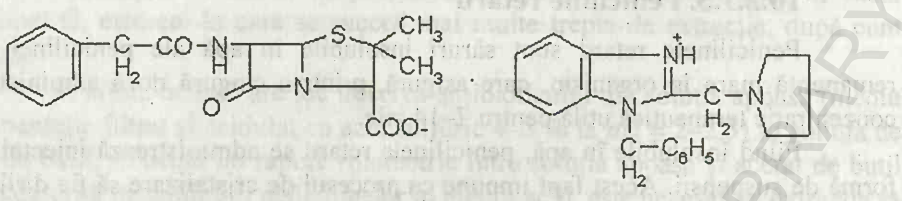
Benzatinpenicilina G (*Moldamin*, *Extencilline*, *Retarpen*) este sarea penicilinei G cu N,N'-dibenziletilendiamina.



Benzatinpenicilina G se obține prin tratarea soluției apoase de benzilpenicilină sodică cu diacetat de N,N'-dibenziletilendiamină. Are un timp de acțiune de 5–6 zile și poate fi administrată atât intramuscular, cât și oral, fiind rezistentă la *p*H-ul sucului gastric.

Atât procainpenicilina G, cât și benzatinpenicilina G se condiționează cu ajutorul citratului trisodic (stabilizator al penicilinelor) și a unor agenți de dispersie, ca Tween 80.

Clemizolpenicilina G este sarea penicilinei G cu clemizolul (1-*p*-clorbenzil-2-pirolidino-metil-benzimidazol), având structura:



Acest produs prezintă proprietăţi antifungice şi antihistaminice, astfel încât, asociat cu penicilina, măreşte, prin sinergism, spectrul de acţiune al acesteia şi, în acelaşi timp, toleranţa la penicilină a bolnavilor sensibili la acest antibiotic.

10.2.1.4. Peniciline de semisinteză

Intermediarul cheie folosit pentru obţinerea penicilinelor de semisinteză este acidul 6-aminopenicilanic. Izolat iniţial din mediile de cultură ale *P. chrysogenum* care nu conţineau precursori, acidul 6-AP a suscitat imediat un interes deosebit datorită perspectivelor de valorificare a acestuia pentru obţinerea de noi peniciline.

10.2.1.4.1. Obţinerea acidului 6-aminopenicilanic

În prezent se utilizează în mod curent două tipuri de procedee pentru obţinerea acestui aminoacid, ambele bazate pe hidroliza penicilinelor G sau V.

Hidroliza chimică a penicilinelor. Un procedeu tipic de sinteză chimică a acidului 6-AP, pornind de la penicilina G, cuprinde etapele prezentate în schema 10.1.

Prima etapă a acestui procedeu constă în protejarea grupei carboxil a penicilinei, de obicei sub forma unui ester metilsilanic, în prezenţa unei baze organice slabe, ca acceptor de proton. Această reacţie se realizează într-un solvent nepolar (CH_2Cl_2), cu ajutorul unui agent de sililare adecvat, de obicei dimetildiclorsilan. Reacţia fiind exotermă, se efectuează la temperaturi scăzute.

În etapa a doua are loc transformarea esterului într-o iminoclorură, sub acţiunea pentaclorurii de fosfor, la temperaturi scăzute.

Iminoclorura se transformă ulterior în iminoeter prin alcooliză cu *n*-butanol. Întrucât această reacţie este foarte exotermă, se impune răcirea prealabilă a *n*-butanolului şi folosirea unor temperaturi de aproximativ –60°C, realizate cu azot lichid.

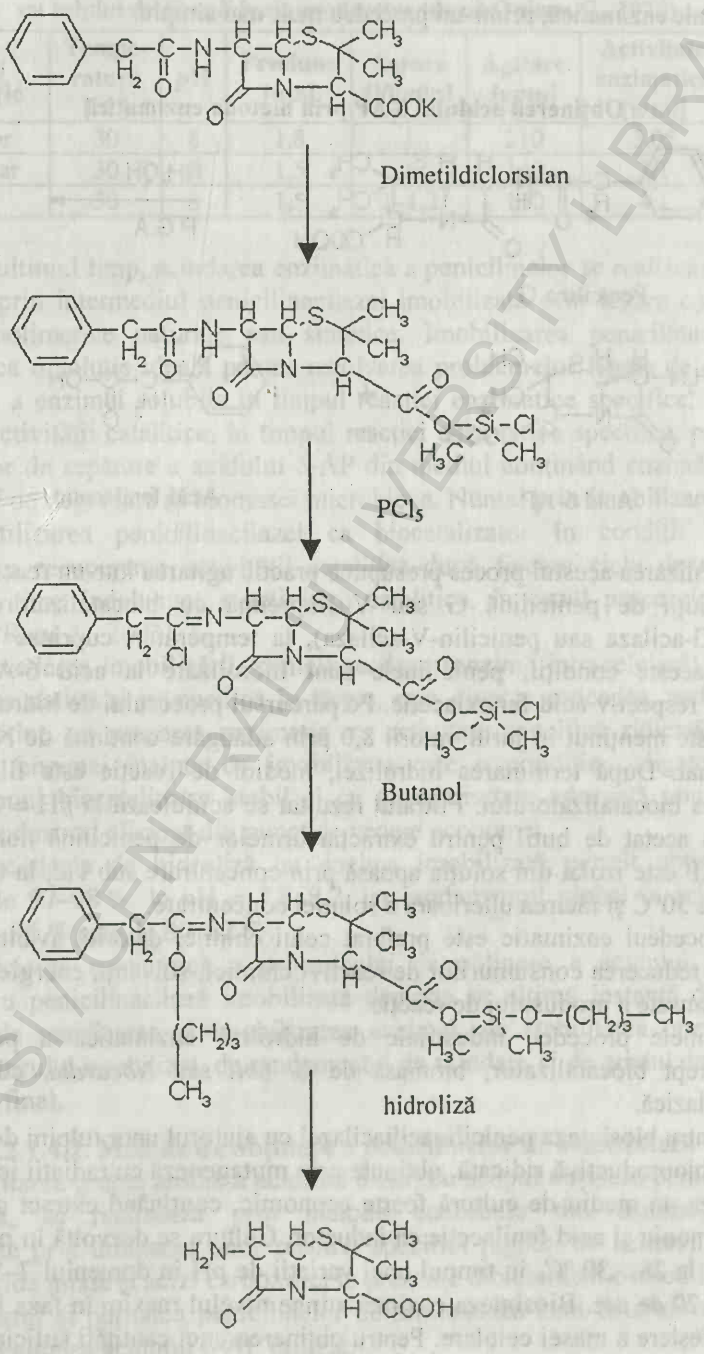
În ultimele etape ale sintezei se realizează hidroliza grupei *imină* şi deprotejarea terminală a grupei *carboxil* din nucleul *penam*.

Acidul 6-AP se separă din mediul de reacţie prin cristalizare la *p*H = 4.

Costurile de producere a acidului 6-AP prin acest procedeu sunt influenţate, pe lângă randamentul global al sintezei, de randamentele de recuperare a *n*-butanolului, a dimetilanilinei (baza organică utilizată în mod frecvent în etapa de esterificare) şi a acidului fenilacetic.

Schema 10.1

Obținerea acidului 6-AP prin metoda chimică

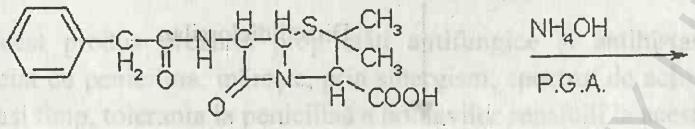


BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Hidroliza enzimatică a penicilinelor G şi V. După cum se poate observa din schema 10.2, hidroliza grupei amidă din catena laterală a penicilinelor se poate realiza pe cale enzimatică, printr-un procedeu mult mai simplu.

Schema 10.2

Obţinerea acidului 6-AP prin metoda enzimatică



Penicilina G

Acid 6-AP + Acid fenilacetic

Realizarea acestui proces presupune practic agitarea într-un reactor adecvat a unei soluţii de penicilină G sau V împreună cu biocatalizatorul specific (penicilin-G-acilaza sau penicilin-V-acilaza), la temperaturi cuprinse între 30 şi 37°C. În aceste condiţii, penicilinele sunt hidrolizate la acid 6-AP şi acid fenilacetic, respectiv acid fenoxiacetic. Pe parcursul procesului de hidroliză, *p*H-ul mediului este menţinut în jurul valorii 8,0 prin adăugare continuă de NH_4OH sau NaOH diluat. După terminarea hidrolizei, mediul de reacţie este filtrat pentru îndepărtarea biocatalizatorului. Filtratul rezultat se acidulează la *p*H = 2–2,5 şi se tratează cu acetat de butil pentru extracţia urmelor de penicilină nereacţionată. Acidul 6-AP este izolat din soluţia apoasă prin concentrare sub vid, la temperaturi mai mici de 30°C şi răcirea ulterioară a soluţiei concentrate.

Procedeul enzimatic este preferat celui chimic, datorită avantajelor care decurg din reducerea consumurilor de reactivi chimici, solvenţi, energie şi datorită purităţii avansate a produsului de reacţie.

Primele procedee industriale de hidroliză enzimatică a penicilinelor utilizau, drept biocatalizator, biomasă de *E. coli* sau *Nocardia,* cu activitate peniclinacilazică.

Pentru biosinteza penicilinaciliacilazei cu ajutorul unor tulpini de *E. coli* cu capacitate bioproductivă ridicată, obţinute prin mutageneză cu radiaţii ionizante, se poate utiliza un mediu de cultură foarte economic, conţinând extract de porumb, sulfat de amoniu şi acid fenilacetic ca inductor. Cultura se dezvoltă în profunzime, sub agitare la 28...30 °C, în timpul unei variaţii de *p*H în domeniul 7–8,2, într-un interval de 20 de ore. Biosinteza enzimei atinge nivelul maxim în faza logaritmică târzie de creştere a masei celulare. Pentru obţinerea unei cantităţi suficient de mari de biomasă activă, utilizabilă ca biocatalizator, acest proces de fermentaţie se realizează în trepte: inoculator, intermediar, regim [Oniscu C., 1978].

Tabelul 10.9

Parametrii caracteristici procesului de biosinteză a penicilinacilazei cu tulpini de *E. coli* înalt productive (după Oniscu C., 1978)

Faza de fermentație	Temperatură [°C]	*p*H	Presiune [ata]	Aerare [l/l/min]	Agitare [rpm]	Activitate enzimatică [u/ml]	Timp [h]
Inoculator	30	8	1,8	1	210	3,05	18–20
Intermediar	30	8	1,5	1	140	3,1	18–20
Regim	30	8	1,5	1–1,2	110	4,1	20

În ultimul timp, scindarea enzimatică a penicilinelor se realizează, la nivel industrial, prin intermediul penicilinacilazei imobilizată prin legare covalentă pe suporturi polimerice naturale sau sintetice. Imobilizarea penicilinacilazei s-a evidențiat ca o soluție ideală pentru rezolvarea problemelor legate de degradarea ireversibilă a enzimei solubile în timpul reacției enzimatice specifice, însoțită de pierderea activității catalitice, în timpul reacției enzimatice specifice, precum și a dificultăților de separare a acidului 6-AP din mediul conținând enzimă degradată sau produși de degradare ai biomasei microbiene. Numai prin imobilizare a devenit posibilă utilizarea penicilinacilazei ca biocatalizator în condiții industriale eficiente, cu recuperarea activității catalitice după fiecare ciclu de reacție sau menținerea timp îndelungat a activității catalitice, în cazul proceselor continui [Swaroopa Rani A., 2003]..

În vederea imobilizării, penicilinacilaza (enzimă intracelulară) se extrage din biomasa nativă și se purifică în trepte, prin diverse procedee, astfel încât în final se obține un preparat enzimatic cu activitate specifică ridicată. Puritatea avansată a enzimei înainte de imobilizare este o condiție obligatorie pentru obținerea unui biocatalizator stabil și cu productivitate adecvată unui procedeu enzimatic industrial eficient din punct de vedere economic.

Procedeele de hidroliză cu enzima imobilizată permit obținerea unor conversii de 97–98 %, la *p*H = 7,8–8,2, iar randamentul global în acid 6-AP de puritate 95–96 % este de 80–82 %.

Eficiența economică a procedeului de obținere a acidului 6-AP prin hidroliză cu penicilinacilază imobilizată depinde în ultimă instanță de costurile implicate de purificarea și imobilizarea enzimei, de stabilitatea operațională a biocatalizatorului imobilizat, de randamentul de scindare și de gradul de puritate al produsului final.

10.2.1.4.2. Metode de obținere a penicilinelor de semisinteză

Acilarea grupei amină a acidului 6-AP, cu scopul obținerii penicilinelor de semisinteză, se realizează prin metode cunoscute din sinteza peptidică, caracterizate prin utilizarea unor reactivi specifici (agenți de acilare): cloruri de acil, anhidride mixte și acizi carboxilici în prezența diciclohexil-carbodiimidei.

Costul și puritatea penicilinelor de semisinteză sunt determinate în mare măsură de calitatea acidului 6-AP utilizat.

a) ***Metoda clorurii de acil.*** Cea mai des utilizată metodă de obținere a penicilinelor de semisinteză se bazează pe reacția de acilare a acidului 6-AP cu clorurile unor acizi organici, conținând radicalul care interesează.

$$P-NH_2 + Cl-CO-R + NaHCO_3 \rightarrow P-NH-CO-R + NaCl + CO_2\uparrow$$

unde: P reprezintă nucleul penam, deci P–NH_2 reprezintă acidul 6-aminopenicilanic

Reacția se realizează în prezență de trietilamină și $NaHCO_3$, în solvent organic, mediu apos sau amestec apă-acetonă, în funcție de proprietățile caracteristice clorurii acide. Dacă clorura acidă nu este stabilă în apă, condensarea se efectuează într-un solvent anhidru: acetonă, diclormetan, cloroform etc.

Procedeul de acilare a acidului 6-AP cu cloruri de acil are avantajul unei tehnologii reproductibile, care se poate realiza cu randamente mari, cu ajutorul unei aparaturi relativ simple.

În locul clorurii acide se pot utiliza bromuri acide.

b) ***Metoda anhidridelor mixte.*** Anhidridele mixte sunt anhidride care rezultă prin tratarea acizilor carboxilici cu cu clorocarbonați (cloroformiați) de alchil (etil sau izobutil), în prezența aminelor terțiare. Ele se utilizează pentru obținerea penicilinelor de semisinteză cu o catenă laterală provenind de la un acid organic a cărui clorură de acil este greu de obținut.

$$R-COOH + Cl-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-OC_2H_5 + (C_2H_5)_3N \rightarrow R-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-O-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-OC_2H_5 + (C_2H_5)_3N\cdot HCl$$

$$R-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-O-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-OC_2H_5 + NH_2-P \longrightarrow R-CO-NH-P + CO_2 + C_2H_5OH$$

c) ***Metoda diciclohexilcarbodiimidei (DCC).*** Acizii organici pot fi activați în vederea cuplării cu acidul 6-AP, prin intermediul unor derivați de carbodiimide, cunoscuți din sinteza peptidică sub denumirea de „reactivi de cuplare". Cel mai des utilizat reactiv de acest gen este diciclohexilcarbodiimida.

Activarea cu diciclohexilcarbodiimidă (DCC) a acidului carboxilic conținând catena de interes, se realizează prin formarea unui compus de adiție:

$$R-COOH + C(=N-C_6H_{11})(-N-C_6H_{11}) \longrightarrow R-COO-C(-NH-C_6H_{11})(=N-C_6H_{11})$$

Acest intermediar, cu reactivitate foarte mare și caracter puternic electrofil, atacă ulterior grupa amină a acidului 6-AP.

$$R-CO-O-C(-NH-C_6H_{11})(=N-C_6H_{11}) + H_2N-P \longrightarrow R-CO-NH-P + C(=O)(-NH-C_6H_{11})_2$$

Reacția are loc la temperatura camerei, de obicei în mediu de tetrahidrofuran (THF), sub agitare energică. Diciclohexil-ureea (DCU), produs secundar al reacției, cristalizează în urma diluării cu apă a mediului în finalul reacției și se îndepărtează prin filtrare.

10.2.1.4.3. Tehnologia de obținere a penicilinelor de semisinteză prin metoda clorurii de acil

Pentru acilarea grupei amină a acidului 6-AP cu diverse cloruri de acil se folosește o tehnologie comună, pe baza căreia se pot obține diferite peniciline de semisinteză, în funcție de structura clorurii de acil folosită. Această tehnologie cuprinde următoarele etape:

– sinteza clorurii acide;

– condensarea clorurii acide cu acidul 6-AP;

– separarea, cristalizarea și purificarea penicilinelor de semisinteză obținute.

Clorurile acide se obțin prin tratarea acizilor carboxilici cu agenți de clorurare ca oxiclorura de fosfor, pentaclorura de fosfor sau clorura de tionil; reacția se poate realiza în prezența unor solvenți organici (benzen, dicloretan, eter, cloroform) sau în absența acestora. Utilizarea clorurii de tionil prezintă avantajul că produșii secundari de reacție, dioxidul de sulf și HCl, pot fi îndepărtați ușor din mediu. Dacă clorurarea are loc în solvent organic, raportul agent de clorurare/acid carboxilic este mai mic decât în cazul clorurărilor în absența solvenților, când agentul de clorurare este folosit în exces, el fiind și mediu de reacție.

Clorura acidă se prepară într-un reactor special destinat operațiilor de clorurare, în care se introduce mai întâi acidul organic, apoi clorura de tionil și solventul, după care amestecul de reacție se încălzește la temperatura de reflux a solventului sau a clorurii de tionil. De obicei clorurarea în solvent organic durează mai mult decât în absența acestuia. După terminarea reacției se efectuează distilarea fracționată a solventului și a clorurii de tionil la presiune normală, apoi se distilă sub vid clorura acidă. În final, aceasta se dizolvă în acetonă sau diclormetan și se trimite în reactorul de condensare. În acest reactor se introduce în prealabil același solvent, apoi acidul 6-AP și după dizolvarea acestuia, trietilamină, care are rolul de a salefia grupa carboxil a acidului 6-AP și bicarbonat de sodiu pentru neutralizarea acidului clorhidric degajat din reacție.

Reacția de condensare se realizează de obicei în două trepte: mai întâi masa de reacție se răcește și se menține sub agitare la temperatura de –15°C, timp de 90 minute, apoi se încălzește ușor, pentru perfectarea reacției, la 0...20 °C timp de 30–60 minute. În final, amestecul se răcește din nou la 0...5 °C și se acidulează la *p*H = 2–2,5 pentru eliberarea penicilinei în formă acidă, care se extrage în acetat de butil. Faza organică, ce conține penicilină, se reintroduce în reactorul de condensare unde se spală cu apă și separă din nou. Extractul organic astfel obținut se deshidratează pe sulfat de sodiu anhidru și se tratează cu acetat de sodiu sau potasiu pentru precipitarea penicilinei sub formă de sare; aceasta se filtrează și se usucă în general la temperatura de 50...60 °C, sub vid ușor.

10.2.1.4.4. Exemple de peniciline de semisinteză

Valorificarea la nivel industrial a procedeelor de acilare a acidului 6-AP cu cloruri de acil (conform tehnologiei prezentate) sau cu anhidride a permis obținerea de noi peniciline, de semisinteză, cu proprietăți farmacologice superioare penicilinelor naturale, atât din punct de vedere al acțiunii antibacteriene (spectrul și potența), cât și din punct de vedere al biodisponibilității. În tabelul 10.10 sunt prezentate câteva din cele mai des folosite peniciline de semisinteză și proprietățile care determină superioritatea acțiunii lor farmacologice.

Tabelul 10.10

Caracteristicile unor peniciline de semisinteză comparativ cu penicilinele naturale

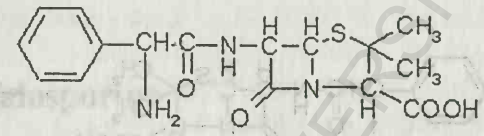
Antibiotic	Stabilitate		Acțiune antibacteriană
	față de penicilinază	în mediu acid	
1	2	3	4
Penicilina G	–	–	– bactericidă, cu spectru limitat la germenii G^+, în special coci (stafilococi neproducători de penicilinază); – inactivă față de bacilul *Koch, Salmonella, Shigella, Proteus.*
Penicilina V	–	–	– în general asemănătoare penicilinei G; – mai activă decât penicilina G pe câțiva stafilococi; – mai puțin activă decât penicilina G față de streptococi.
Amoxicilina	–	+	– bactericidă, cu spectru larg; – germeni G^+: stafilococi, streptococi, pneumococi, enterococi sensibili la penicilină; – germeni G^-: *E. coli, Pr. mirabilis, Salmonella, Shigella, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis.*
Ampicilina	–	+	– bactericidă, superioară penicilinei G prin spectrul larg de acțiune, dar inferioară acesteia ca intensitate a acțiunii față de stafilococi și streptococi; – germeni G^-: *E. coli, Pr. mirabilis, Salmonella, Shigella, Haemophilus influenzae, Klebsiella.*
Carbenicilina	+ (cu excepția celei produse de stafilococi)	–	– spectru larg, incluzând unele specii de *Serratia, Providencia,* tulpini de *Klebsiella* și *E. coli* rezistente la ampicilină și multe tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* și *Proteus indol pozitiv;* – inactivă față de *Streptococcus faecalis.*

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 10.10 (continuare)

1	2	3	4
Oxacilina	+	+	– spectru antibacterian limitat la germenii G^+; – activă față de stafilococii rezistenți la penicilina G (penicilinazo-secretori); – inactivă față de *Streptococcus faecalis*.

Ampicilina (acid 6-D(-)-α-amino-fenilacetamido-penicilanic sau D-α-aminobenzilpenicilina)



Ampicilina este un antibiotic de semisinteză cu spectru larg de acțiune, care, ca substanță activă, are aspectul unei pulberi microcristaline, de culoare albă, cu gust amar, fără miros sau cu miros slab, cu p.t. = 199...202 °C. Cristalizează sub două forme: anhidră și trihidrat. În forma acidă, ampicilina este greu solubilă în apă și insolubilă în alcool, cloroform, acetonă, eter.

Sarea de sodiu a ampicilinei se obține sub forma unei pulberi cristaline, higroscopice, fără miros, sau cu miros slab, caracteristic, cu gust amar, foarte ușor solubilă în apă, solubilă în acetonă, greu solubilă în cloroform și insolubilă în eter.

Cele două forme cristaline ale ampicilinei acide se deosebesc, în principal, prin solubilitate (forma anhidră este mai solubilă în apă decât forma trihidrat). Datorită diferenței de solubilitate, cele două forme se absorb cu viteze diferite și, în ultimă instanță, ating valori diferite ale concentrației serice maxime (tabelul 10.11) [Oniscu C., 1978].

Tabelul 10.11

Absorbția formelor polimorfe ale ampicilinei

Forma polimorfă	Concentrație maximă în ser	
	[μmoli/ml]	[minute]
Anhidră	2,2	60
Trihidrat	1,7	120

Pentru obținerea ampicilinei la nivel industrial se folosesc ca materii prime fenilglicina, clorura de tionil și acidul 6-AP și se parcurg următoarele etape:

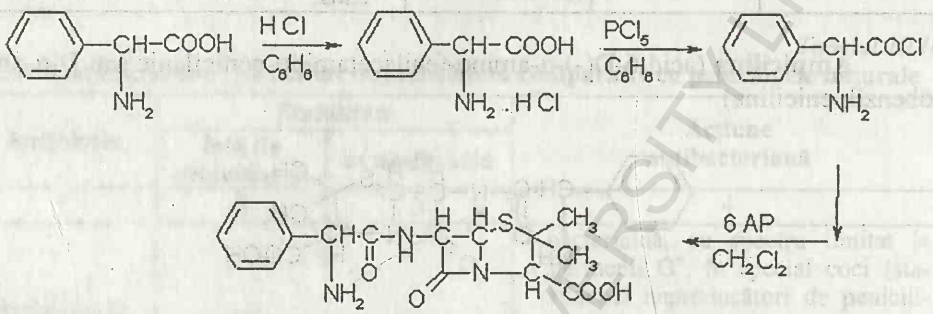
– transformarea fenilglicinei în clorhidrat, prin tratare cu HCl gazos, în mediu de benzen;

– obținerea clorurii de fenilglicină prin tratarea clorhidratului aminoacidului cu clorură de tionil sau pentaclorura de fosfor, în mediu de benzen;

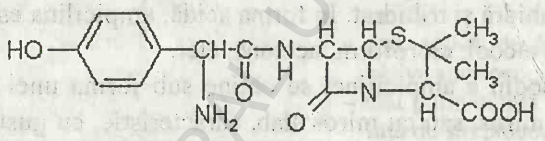
– condensarea clorurii acide cu acid 6-AP în acetonă sau diclormetan, în prezența unor baze necesare pentru neutralizarea HCl degajat.

Schema 10.3

Obținerea ampicilinei

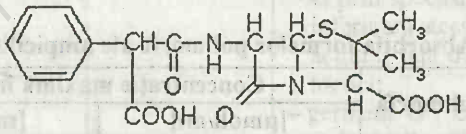


Amoxicilina (acid 6-D(-)-α-amino- α –(p-hidroxi)-fenilacetamido-penicilanic sau D-α-amino-p-hidroxibenzilpenicilina)



Din punct de vedere farmacocinetic, amoxicilina este superioară ampicilinei, în sensul că are o absorbție mai bună datorată prezenței grupei OH, ceea ce permite atingerea unor concentrații sanguine ridicate în timp scurt, de unde și eficacitatea terapeutică rapidă.

Carbenicilina (α-carboxibenzilpenicilina)



Carbenicilina este un antibiotic cu spectru larg de acțiune, activ atât asupra germenilor gram-pozitivi cât și celor gram-negativi, dar se degradează ușor în mediu acid: timpul de înjumătățire a activității la *p*H = 2 este de 140 minute, la 25°C și de 30 minute, la 37°C. Ca urmare, acest antibiotic nu se administrează decât pe cale injectabilă.

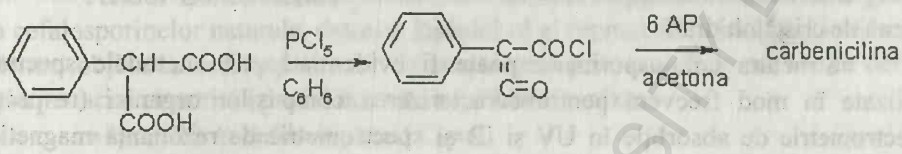
În formă acidă are aspectul unei de culoare albă, gust amar și este insolubilă în apă și solubilă în solvenți organici. Se utilizează sub formă de sare

disodică; aceasta este foarte higroscopică, solubilă în apă, alcool metilic şi alcool etilic, insolubilă în cloroform şi eter.

Carbenicilina se poate obţine prin acilarea acidului 6-AP cu două tipuri de derivaţi ai acidului fenilmalonic: clorura acidă a unui monoester uşor clivabil sau clorcetena acidului fenilmalonic (ultima variantă este prezentată în schema 10.4).

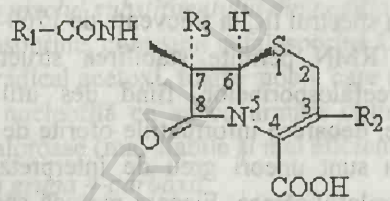
Schema 10.4

Obţinerea carbenicilinei



10.2.2. Cefalosporine

Cefalosporinele sunt antibiotice β-lactamice caracterizate printr-o structură biciclică comună, denumită nucleu cefem, alcătuită dintr-un heterociclu β-lactamic condensat cu un heterociclu dihidrotiazinic.



Primele substanţe cu această structură au fost descoperite în mediul de cultură al unei tulpini de *Cephalosporium acremonium* şi, în ciuda activităţii antibacteriene modeste, au atras atenţia datorită rezistenţei lor în mediu acid şi faţă de acţiunea β-lactamazelor.

Deşi cefalosporinele de biosinteză sunt puţin active şi nu au aplicaţii terapeutice, modificarea, în anumite limite, a structurii lor naturale, a condus la obţinerea unor antibiotice caracterizate printr-o activitate antibacteriană puternică şi un spectru antibacterian extins, care, ca şi în cazul penicilinelor, variază în funcţie de natura substituenţilor din catena laterală şi din ciclul dihidrotiazinic.

10.2.2.1. Proprietăţile cefalosporinelor

a) *Proprietăţi fizice.* Cefalosporinele sunt substanţe solide, cristaline sau amorfe, de culoare albă. Deoarece se descompun în timpul încălzirii la temperaturi ridicate, ele nu au puncte de topire nete.

Cefalosporinele au caracter de acizi de tărie medie, proprietate datorată grupei 4-carboxil care, alături de substituenţii din poziţiile 3 şi 7, determină solubilitatea în diverşi solvenţi organici.

În formă acidă, cefalosporinele sunt greu solubile în apă şi hidrocarburi; cele care conţin o catenă laterală lipofilă sunt solubile în alcooli, acetat de etil, acetonă, iar cele care conţin o grupă polară au un caracter hidrofil datorită căruia prezintă solubilitate în apă.

Sărurile de sodiu şi potasiu ale cefalosporinelor sunt în general uşor solubile în apă, solubile în alcooli inferiori şi greu solubile în alcooli superiori, acetonă, cloroform, eteri.

Cefalosporinele şi sărurile lor solubile în apă pot fi în general izolate sub formă de cristalohidraţi.

Structura cefalosporinelor poate fi evidenţiată prin metodele spectrale utilizate în mod frecvent pentru caracterizarea compuşilor organici (respectiv spectrometrie de absorbţie în UV şi IR şi spectrometrie de rezonanţă magnetică nucleară).

Spre deosebire de peniciline, a căror structură de bază nu poate fi evidenţiată prin spectre de absorbţie în UV, cefalosporinele prezintă o bandă de adsorbţie caracteristică în UV, la $\lambda = 260$ nm, atribuită legăturilor O=C–N–C=C–, cu participarea posibilă a atomului de sulf din nucleu.

Ca şi în cazul penicilinelor, legătura β-lactamică imprimă cefalosporinelor o absorbţie caracteristică în spectrul IR, la frecvenţe de 1760–1780 cm^{-1}.

Spectrometria de RMN permite stabilirea structurii moleculare şi a configuraţiei spaţiale a cefalosporinelor, fiind des utilizată în completarea spectrometriei de absorbţie, deoarece informaţiile oferite de spectrometria IR sunt foarte bogate şi de aceea sunt uneori greu de interpretat, iar cele oferite de spectrometria în UV sunt relativ sărace. Fiecare metodă spectrală aduce un aport specific în anumite cazuri particulare.

b) ***Proprietăţi chimice.*** Cunoaşterea proprietăţilor chimice ale cefalosporinelor naturale este deosebit de importantă, pe de o parte pentru evitarea condiţiilor ce duc la degradarea lor şi pe de altă parte, pentru stabilirea acelor modificări structurale care au efecte pozitive asupra proprietăţilor lor biologice [Diaconu E., 1988].

Ca urmare a structurii lor complexe, cefalosporinele prezintă o reactivitate chimică remarcabilă. Principalele transformări care afectează activitatea farmacologică a acestor antibiotice sunt prezentate în continuare:

• *scindarea nucleul β-lactamic la nivelul legăturii C-N*

Degradarea nucleului β-lactamic conduce la dispariţia efectului terapeutic al tuturor antibioticelor din această familie.

Ca şi în cazul penicilinelor, desfacerea nucleului β-lactamic se realizează relativ uşor, sub acţiunea reactanţilor nucleofili (ioni hidroxil, amine primare, hidroxilamină), elecrofili, a β-lactamazelor şi chiar în prezenţa apei.

Cele două tipuri de antibiotice β-lactamice se diferențiază totuși prin viteza reacțiilor de degradare a nucleului β-lactamic. Astfel, cefalosporinele sunt mai stabile decât penicilinele în mediu acid, precum și față de alcooli inferiori (metanol, etanol).

• *hidroliza grupei amidă din poziția 7*

Grupa 7-acilamină poate fi hidrolizată la amina corespunzătoare (acidul 7-aminocefalosporanic) pe cale chimică sau enzimatică.

Acidul 7-aminocefalosporanic este cel mai important produs de degradare a cefalosporinelor naturale, datorită faptului că el reprezintă principalul intermediar pentru obținerea cefalosporinelor de semisinteză prin reacții de acilare cu derivați ai unor acizi organici (cloruri de acil sau anhidride mixte).

• *reacțiile la dubla legătură C_3=C_4*

Această dublă legătură este puțin reactivă, întrucât atomii de carbon participanți sunt tetrasubstituiți și fac parte dintr-un sistem enamidic. Totuși, hidrogenarea acestei legături conduce la obținerea 3,4-dihidrocefalosporinei, care nu prezintă activitate antibacteriană. De asemenea, cefalosprinele ce conțin grupa 4-COOH esterificată se pot inactiva prin izomerizare sub influența bazelor organice, cu deplasarea dublei legături în poziția C_2=C_3.

• *reacțiile la nivelul substituentului din poziția C_3*

Unele cefalosporine, cum sunt cefalosporina C și cefalotina, conțin la C_3 o grupă metilen și un radical acetoxi, foarte mobil, care poate fi implicat în reacții de hidroliză acidă sau nucleofilă ce au ca urmare obținerea unor cefalosporine de semisinteză foarte valoroase (mai stabile și mai eficiente terapeutic).

• *reacțiile la grupa 4-carboxil*

Grupa 4-carboxil poate participa la reacții caracteristice acizilor carboxilici, în urma cărora se obțin săruri, esteri sau amide.

Reacția de esterificare este importantă, întrucât este utilizată ca etapă intermediară în obținerea acidului 7-aminocefalosporanic pe cale chimică, plecând de la cefalosporina C.

Grupa 4-COOH poate fi eliminată din structura de bază a cefalosporinelor prin încălzire, la *p*H acid, în solvenți anhidri, caz în care se obțin substanțe inactive biologic.

• *reacțiile atomului de sulf*

Atomul de sulf din structura cefalosporinelor se poate oxida în prezența peracizilor organici, în solvenți apoși sau anhidri, obținându-se un amestec de sulfoxizi inactivi .

În general, reacțiile de oxidare și reducere ale atomului de sulf sunt utilizate ca metode de control al poziției dublei legături.

• *substituirea atomului de hidrogen din poziția C_7*

Înlocuirea atomului de hidrogen de la C_7 cu un radical *metoxi* sau *alchil* conduce la obținerea cefamicinelor, antibiotice caracterizate prin stabilitatea față de β-lactamazele produse de bacteriile gram-negative.

c) ***Proprietăți biologice.*** Eficiența și viteza de acțiune a antibioticelor β-lactamice sunt dependente de absorbția și transportul acestora în peretele celular, de legarea de receptorii specifici și de inhibarea efectivă a acțiunii enzimelor țintă. Aceste procese sunt influențate de structura moleculară a antibioticului și determină spectrul și intensitatea acțiunii antibacteriene. În cazul cefalosporinelor, condițiile structurale fundamentale pentru activitatea antibacteriană sunt:

– *integritatea* celor două inele condensate în nucleul *cefem*, scindarea acestora în orice punct ducând la pierderea completă a activității antibacteriene, indiferent de substituenți;

– *reactivitatea legăturii β-lactamice* este corelată cu capacitatea sa de a inactiva enzimele implicate în sinteza peretelui celular; ca atare, modificările ce măresc tăria legăturii β-lactamice, reduc în general activitatea antibacteriană;

– *menținerea unei anumite configurații sterice:* cele două inele condensate în nucleul cefem nu sunt coplanare, iar atomii și grupările atașate lor pot ocupa poziții diferite. Activitatea antibacteriană este corelată cu următoarea configurație: grupa 7-acilamină are orientarea „S", iar cei doi atomi de hidrogeni legați de C_6 și C_7 au orientarea „R" și poziția reciprocă „cis";

– *prezența în nucleul dihidrotiazinic a dublei legături* în poziția C_3–C_4;

– *prezența în structura moleculei a grupei 4-carboxil.*

În funcție de proprietățile lor biologice, exprimate prin intensitatea și spectrul de acțiune antibacteriană și rezistența la β-lactamaze, cefalosporinele se încadrează până în prezent în patru generații (tabelul 10.12).

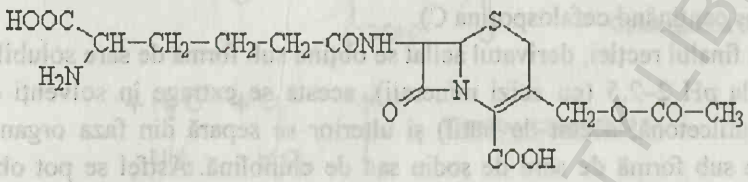
Tabelul 10.12

Clasificarea cefalosporinelor în funcție de proprietățile biologice

Generația	Proprietăți biologice	Exemple reprezentative
I	– active față de bacterii Gram-pozitive și unele Gram-negative; – instabile la acțiunea β-lactamazelor.	Cefalexin, Cefalotin, Cefapirin, Cefadroxil, Cefazolin
II	– spectru antibacterian larg, dar excluzând *Pseudomonas sp.* și *Serratia sp.*; – relativ stabile la acțiunea β-lactamazelor.	Cefaclor, Cefamandol, Cefatrizin, Cefuroxin,
III	– active pe un spectru antibacterian foarte larg, (aproape toate speciile de enterobacteriacee); – moderat active față de *Pseudomonas* și unele bacterii Gram-pozitive; – rezistente la acțiunea β-lactamazelor produse de bacterii Gram-negative.	Cefoperazon, Ceftriaxon, Cefotaxim
IV	– spectru antibacterian foarte larg, incluzând enterobacteriacee, bacterii Gram-pozitive, *Pseudomonas* și tulpini rezistente la cefalosporinele de generația a III-a; – active față de germenii producători de β-lactamaze inductibile.	Cefepima, Cefpiroma

10.2.2.2. Obținerea cefalosporinei C

Cefalosporina C este o cefalosporină naturală, caracterizată prin prezența în catena laterală a radicalului D-α-aminoadipil și a grupei acetoxi în poziția C_3 a nucleului cefem.



Deși această substanță are o activitate bactericidă foarte scăzută, ea se obține la nivel industrial pentru a fi folosită ca materie primă în tehnologia cefalosporinelor de semisinteză.

Biosinteza cefalosporinei C se realizează cu ajutorul unor tulpini de *Cephalosporium acremonium* cu potențial bioproductiv ridicat, obținute de regulă prin modificări genetice.

Compoziția mediilor de cultură și condițiile de fermentație sunt asemănătoare celor utilizate în tehnologia de obținere a penicilinelor naturale.

Datorită naturii sale hidrofile și prezenței în mediul de cultură a altor substanțe cu structură apropiată, având aceeași catenă laterală de acid α-aminoadipic, izolarea cefalosporinei C este foarte dificilă.

Prima etapă de prelucrare post-biosinteză se deosebește de tehnologia penicilinelor prin faptul că filtrarea lichidului de fermentație se realizează după acidularea acestuia la *p*H = 2,5–3, în scopul degradării și precipitării unora din substanțele cu structură asemănătoare și al coagulării proteinelor de balast.

Din filtratul rezultat după separarea miceliului, cefalosporina C se poate izola prin două procedee, respectiv un procedeu de extracție lichid–lichid și un procedeu cromatografic.

a) ***Extracția lichid–lichid.*** Aplicarea acestui procedeu impune modificarea catenei laterale D-α-aminoadipil, în sensul eliminării caracterului hidrofil al acesteia, în vederea obținerii unui derivat extractibil în solvenți organici nemiscibili cu apa.

Pentru modificarea catenei laterale se folosește metoda acilării grupei α-amino cu cloruri acide (clorură de benzoil sau cloracetil) sau cloroformiați (cloroformiat de izobutil). În ambele cazuri este necesară prezența în mediul de reacție a unui acceptor de acid clorhidric, care asigură menținerea *p*H-ului în domeniul neutru sau slab alcalin.

În funcție de concentrația de cefalosporină C din mediul de fermentație (care depinde de productivitatea tulpinii), acilarea se poate efectua direct în lichidul de fermentație filtrat (când există o cantitate suficient de mare de cefalosporină C)

sau în soluții parțial purificate și concentrate corespunzător. În ambele situații agentul de acilare se utilizează în exces, ținând seama de prezența altor aminoacizi în mediu și de reacția competitivă cu apa. Întrucât reactivii de acilare nu sunt miscibili cu apa, asigurarea omogenității mediului și respectiv a condițiilor optime de reacție, impune adăugarea de acetonă (de obicei 1 volum la 1–4 volume de mediu apos conținând cefalosporina C).

În finalul recției, derivatul acilat se obține sub formă de sare solubilă. După acidulare la *p*H 2–2,5 (cu acizi minerali), acesta se extrage în solvenți organici (metilizobutilcetonă, acetat de butil) și ulterior se separă din faza organică prin precipitare sub formă de sare de sodiu sau de chinolină. Astfel se pot obține, cu randamente variind între 50–70 %, săruri de cefalosporină C N-acilată care necesită purificări suplimentare în vederea utilizării ulterioare la prepararea acidului 7-aminocefalosporanic.

Aplicarea acestui procedeu la nivel industrial prezintă următoarele dezavantaje: excesul mare de agent de acilare, utilizarea acetonei care se recuperează greu din soluții apoase, randamentele relativ mici și puritatea uneori necorespunzătoare a preparatelor obținute.

b) ***Procedeul cromatografic.*** Acest procedeu se bazează pe utilizarea cromatografiei de adsorbție combinată cu cromatografia de schimb ionic.

În faza de cromatografie de adsorbție se utilizează coloane umplute cu rășini macroporoase neutre (de tip Amberlite XAD-2 sau XAD-4) care sunt traversate de filtratul rezultat după îndepărtarea miceliului, realizându-se adsorbția selectivă a cefalosorinei C, la *p*H = 2,5–3. Adsorbția cefalosporinei este urmată de spălarea rășinii cu apă, pentru îndepărtarea lichidului interstițial. Eluția antibioticului se realizează cu o soluție alcoolică sau acetonică 10–50 %.

Cefalosporina C din eluatul de pe rășina adsorbantă se purifică în continuare prin cromatografie de schimb ionic pe un anionit slab bazic. După concentrarea eluatului de pe anionit conținând cefalosporina C purificată, aceasta poate fi precipitată prin adăugare de alcool sau acetonă, sub formă de complecși cu ioni de Zn^{2+}, Cu^{2+} sau Cd^{2+}, ioni rămași din filtratul inițial (rășina adsorbantă folosită în prima treaptă cromatografică nu reține ionii anorganici).

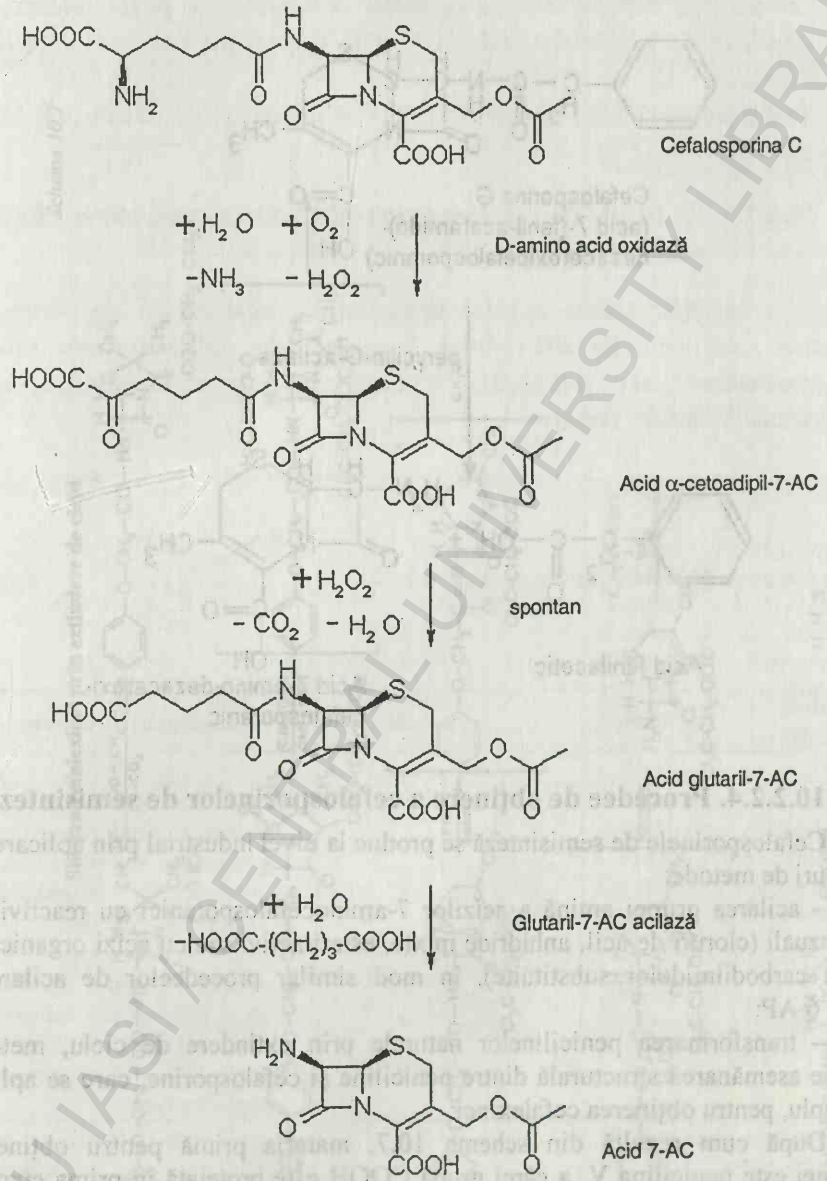
10.2.2.3. Acizii 7-aminocefalosporanici

Hidroliza grupei amidă din poziția C_7 a nucleului cefem conduce la obținerea aminei corespunzătoare, prin acilarea căreia se pot obține cefalosporine de semisinteză cu valoare terapeutică superioară.

Transformarea cefalosporinei C în acid 7-aminocefalosporanic (7-AC) se poate realiza atât pe cale chimică, prin metoda iminoesterilor, aplicată în condiții asemănătoare penicilinelor, cât și prin conversie enzimatică (conform schemei 10.5.)

Schema 10.5

Conversia enzimatică a cefalosporinei C la acid 7-AC

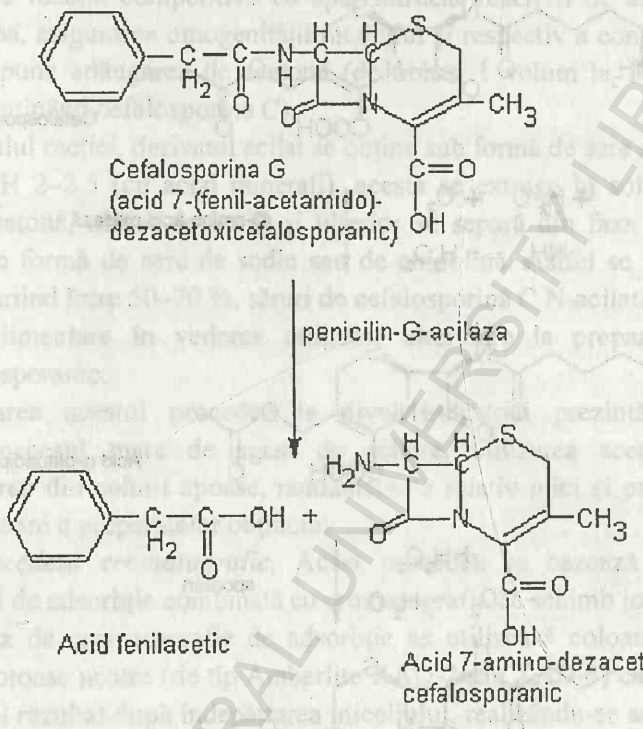


Acidul 7-aminodezaceoxicefalosporanic (7-ADC), se obține în mod asemănător acidului 6-AP, prin hidroliza enzimatică a cefalosporinei G (benzil-dezacetoxicefalosporina) cu ajutorul penicilin-G-acilazei, a cărei specificitate de substrat este suficient de largă pentru a include și legătura fenilacetilamidă din structuri asemănătoare penicilinei (conform schemei 10.6) [Ellaiah P., 2000].

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Schema 10.6

Obținerea acidului 7-ADC prin hidroliză enzimatică



10.2.2.4. Procedee de obținere a cefalosporinelor de semisinteză

Cefalosporinele de semisinteză se produc la nivel industrial prin aplicarea a două tipuri de metode:

– acilarea grupei amină a acizilor 7-aminocefalosporanici cu reactivi de acilare uzuali (cloruri de acil, anhidride mixte, esteri activi sau cu acizi organici în prezența carbodiimidelor substituite), în mod similar procedeelor de acilare a acidului 6-AP;

– transformarea penicilinelor naturale prin extindere de ciclu, metodă bazată pe asemănarea structurală dintre peniciline și cefalosporine, care se aplică, de exemplu, pentru obținerea cefalexinei:

După cum rezultă din schema 10.7, materia primă pentru obținerea cefalexinei este penicilina V, a cărei grupă COOH este protejată în prima etapă a sintezei, prin transformare în esteri 2,2,2-tricloretil, *p*-nitrobenzil sau trimetilsilil.

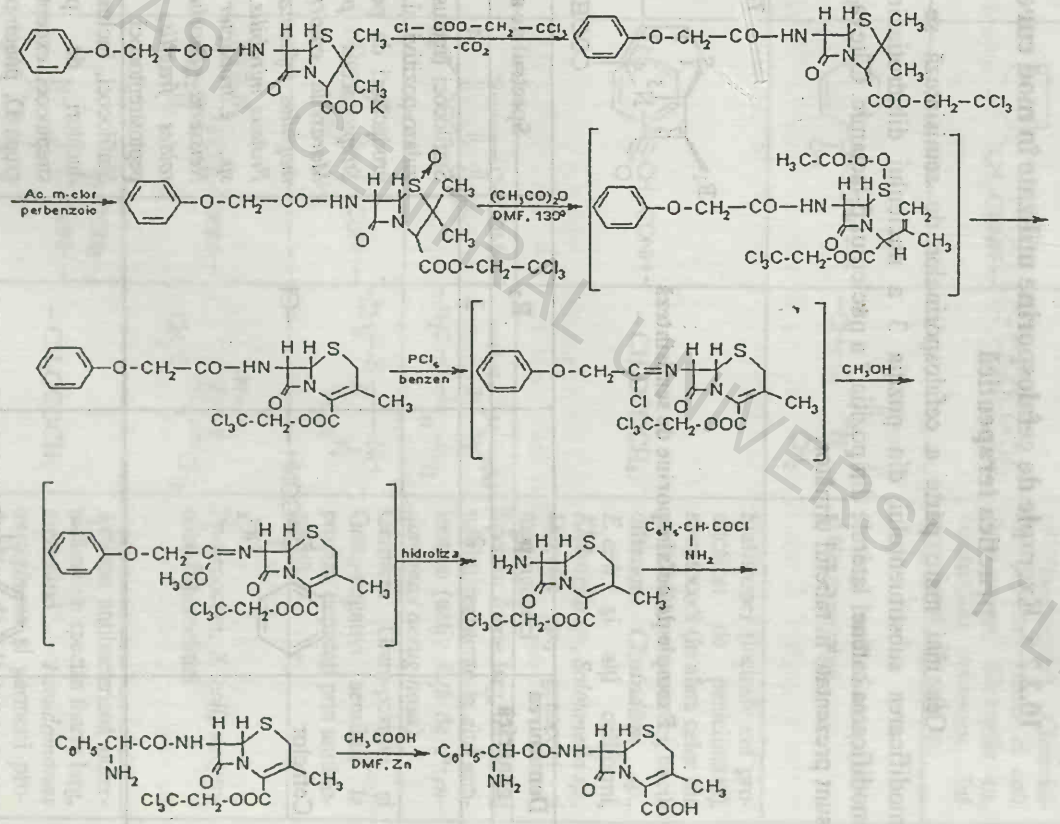
Penicilina astfel protejată se oxidează apoi la sulfoxidul corespunzător, cu ajutorul unor agenți oxidanți adecvați (peracizi organici sau anorganici, ozon).

Heterociclul pentatomic al sulfoxidului penicilinei V protejată se poate extinde prin încălzire în toluen cu urme de acizi sau în alți solvenți (dimetilformamidă) în prezența unor agenți de deshidratare (anhidridă acetică).

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Schema 10.7

Sinteza cefalexinei prin extindere de ciclu



BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Esterul dezacetoxicefalosporinei rezultate în urma extinderii de ciclu se transformă în esterul aminoacidului corespunzător prin metoda iminoeterilor.

Introducerea catenei laterale specifice cefalexinei se poate realiza prin acilarea grupei amină a esterului acidului 7-ADC în urma reacției cu clorura acidă a fenilglicinei.

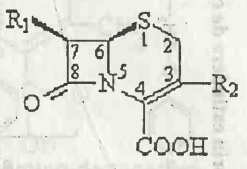
Deprotejarea finală a grupei 4-COOH se realizează de obicei prin hidrogenare catalitică.

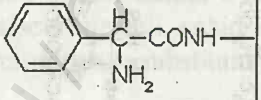
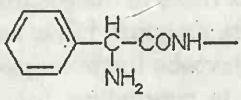
10.2.2.5. Exemple de cefalosporine utilizate în mod curent în practica terapeutică

Cea mai mare parte a cefalosporinelor de semisinteză se obțin prin modificarea substituentului din poziția 3 a nucleului dihidrotiazinic sau/ și modificarea catenei laterale din poziția 7 a nucleului β-lactamic. Câteva din acestea sunt prezentate în tabelul următor.

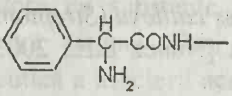
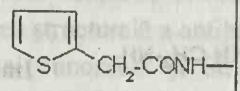
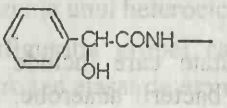
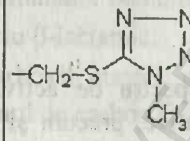
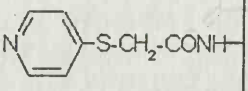
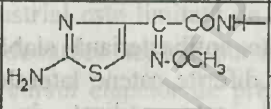
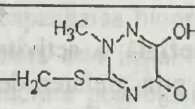
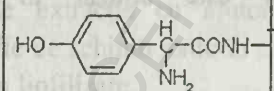
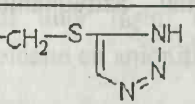
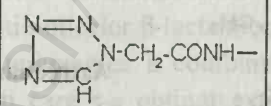
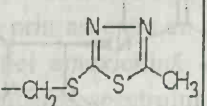
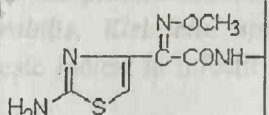
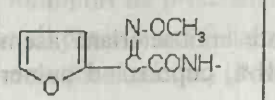
Tabelul 10.13

Exemple de cefalosporine de semisinteză



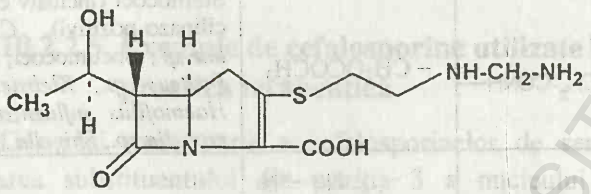
Denumirea generică	R_1	R_2	Spectrul de acțiune
1	2	3	4
Cefaclor		–Cl	Stafilococi (inclusiv cei coagulazo-pozitivi și negativi și producători de penicilinază), *Streptococcus pneumoniae, Moraxella catarralis, Haemophilus influenzae, E. coli, Proteus mirabilis, Klebsiella sp., Citrobacter diversus, Neisseria gonorheae, Bacteroides fragilis,* peptococi, peptostreptococi
Cefadroxil		$-CH_3$	Stafilococi, inclusiv cei producători de penicilinază, streptococi, exceptând cei din grupa D, pneumococi, bacili difterici, *Clostridium sp., E. coli* și alți coliformi, *Klebsiella sp., Proteus sp.,* gonococi, meningococi, *Salmonella sp., Shigella sp.*

Tabelul 10.13 (continuare)

1	2	3	4
Cefalexin		$-CH_3$	Streptococii β-hemolitici, stafilococi (inclusiv cei penicilinazo-pozitivi), pneumococi, *E. coli, Proteus mirabilis, Klebsiella sp., Haemophilus influenzae*
Cefalotin		$-CH_2OCOCH_3$	Stafilococi (inclusiv cei penicilinazo-pozitivi), *Clostridium sp.*, pneumococi, *E. coli, Proteus sp., Klebsiella sp., Haemofilus influenzae, Salmonella sp., Shigella sp.*
Cefamandol			Coci şi bacili Gram-pozitivi şi Gram-negativi
Cefapirin		$-CH_2OCOCH_3$	Stafilococi (inclusiv cei producători de penicilinază), streptococi (în afara celor din grupul D), pneumococi, bacili difterici, *Clostridium sp., E. coli* şi alţi coliformi, *Klebsiella sp., Salmonella sp., Shigella sp.*, gonococi şi meningococi
Ceftriaxon			Spectru foarte larg, incluzând tulpini rezistente la alte antibiotice (activ faţă de *Pseudomonas aeruginosa*)
Cefatrizin			Germeni Gram-pozitivi şi Gram-negativi sensibili la produs, depistaţi prin antibiogramă
Cefazolin			Pneumococi, *E. coli,* streptococii β-hemolitici
Cefotaxim		$-CH_2OCOCH_3$	Acţiune antibacteriană puternică pe un spectru foarte larg, incluzând *Pseudomonas aeruginosa* şi germeni producători de β-lactamaze
Cefuroxim		$-CH_2OCONH_2$	Spectru antibacterian foarte larg, în special faţă de enterobacteriacee

10.2.3. Carbapeneme

Tienamicina, prima moleculă pe care a fost definită structura carbapenem, a fost izolată în 1979 din culturi de *Streptomyces cattleya* (*Streptomyces MA4297*). În prezent se utilizează un derivat al acesteia [Nunez L.E., 2003], obținut prin semisinteză, denumit **imipenem**.



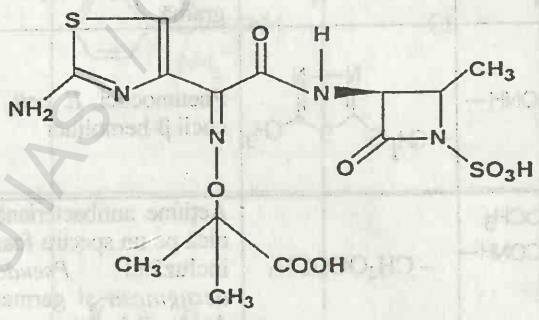
Imipenem

Imipenemul are un spectru de activitate care include bacterii Gram-pozitive şi bacterii Gram-negative, precum şi bacterii anaerobe. El se utilizează frecvent asociat cu cilastatina (L-cisteinil-tio-hexenoat), în tratamentul infecțiilor renale.

10.2.4. Monobactame

Monobactamele sunt **β-lactame monociclice** şi au fost descoperite în 1977 în supernatantele unor culturi bacteriene (*Acetobacter, Gluconobacter, Pseudomonas*).

Compuşii naturali prezintă o activitate antibacteriană slabă, iar dintre compuşii de sinteză, obținuți prin grefarea de diferite catene laterale pe nucleul 3-amino-monobactamic, numai aztreonamul este utilizat în terapeutică [Strohl W.R., 1997].



Aztreonam

Acesta prezintă un spectru de activitate antibacteriană asemănător celui caracteristic cefalosporinelor de generația a III-a, cuprinzând numeroşi germeni Gram-negativi.

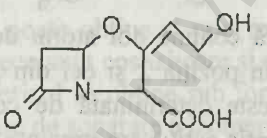
10.2.5. Inhibitori de β-lactamaze

Sensibilitatea la β-lactamaze a antibioticelor poate fi compensată prin asocierea acestora cu substanțe care au proprietatea de a inhiba ireversibil activitatea acestor enzime. Deşi nu au o acțiune antibacteriană remarcabilă, utilitatea terapeutică a asocierii acestor substanțe cu peniciline şi cefalosporine se bazează pe faptul că, având structură β-lactamică, ele concurează cu antibioticele β-lactamice pentru ocuparea centrului catalitic activ al β-lactamazelor, protejând astfel integritatea structurală a antibioticelor.

Cea mai cunoscută şi utilizată substanță cu acțiune inhibitoare asupra β-lactamazelor este acidul clavulanic, compus a cărui structură constă într-un sistem biciclic, denumit *clavam*, asemănător penicilinelor în următoarele privințe:

– prezența unui heterociclu β-lactamic;

– configurația grupei carboxil ataşată de atomul de carbon C_3 şi a atomului de hidrogen ataşat de atomul de carbon C_5.



Acidul clavulanic a fost izolat din mediul de cultură al unui actinomicet – *Streptomyces clavuligenus*. Eficiența tehnologiilor de obținere a acidului clavulanic la nivel industrial este limitată de capacitatea bioproductivă a microorganismului producător, deoarece această substanță este instabilă şi se degradează destul de rapid pe parcursul etapelor de prelucrare post-biosinteză. Acestea se bazează pe procedee de extracție cu ajutorul unor răşini anionice lichide, urmate de cromatografie de schimb ionic în coloane cu anioniți. În final, acidul clavulanic se izolează prin liofilizare.

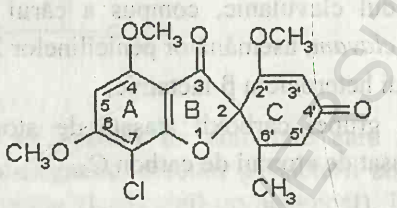
Studiile farmacocinetice şi microbiologice referitoare la potențarea activității antibioticelor β-lactamice prin asociere cu acid clavulanic, au evidențiat eficacitatea terapeutică a combinației amoxicilină – acid clavulanic 2:1 (Augmentin), prin care s-a obținut extinderea spectrului amoxicilinei şi asupra unor tulpini bacteriene producătoare de β-lactamaze, aparținând speciilor *S. aureus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella spp.*, *E. coli*. Datorită acestui fapt, produsul Augmentin este indicat în infecții respiratorii, ale căilor urinare, intraabdominale etc.

Alți inhibitori de β-lactamaze mai sunt: unii tioeteri derivați de la acidul clavulanic, acizii penicilanici 6-halogenați, sulfona acidului penicilanic (sulbactam) şi carbapenemele (tienamicina) [Powers R.A, 1999].

10.3. GRISEOFULVINA

Griseofulvina este un alt antibiotic produs de fungi din genul *Penicillium*, având proprietăți total diferite de cele caracteristice penicilinelor.

Molecula griseofulvinei are o structură spiranică, rezultată din existența unui atom de carbon comun unei structuri de tip cumaran și unui derivat de ciclohexenă. Structura de tip cumaran se caracterizează printr-un ciclu benzenic (A), pe care sunt grefate două grupe metoxi și un atom de clor și care este condensat cu un ciclu tetrahidrofuranic (B) ce poartă o grupă cetonică. Al treilea ciclu (C) este o ciclohexenonă disubstituită cu o grupă metoxi și o grupă metil.



Deși această structură conține doi atomi de carbon asimetrici, respectiv atomul de carbon spiranic din poziția 2 și cel din poziția 6', activitatea optică a moleculei de griseofulvină este determinată de configurația substituenților din poziția 6'. Singurul izomer optic activ care prezintă și activitate biologică este cel în care grupa metil din poziția 6' este orientată în poziția *cis* față de grupa cetonă din poziția 3. Această configurație este caracteristică griseofulvinei obținută prin biosinteză.

10.3.1. Proprietăți fizico-chimice și biologice

Ca substanță activă, griseofulvina are aspectul unei pulberi cristaline, de culoare galbenă, cu punct de topire la 218...219 °C. Este insolubilă în apă, greu solubilă în solvenți ca toluen, acetonă, acetat de etil și solubilă în diclormetan, dicloretan, cloroform, dimetilformamidă.

Spre deosebire de antibioticele β-lactamice, griseofulvina este stabilă în soluții în domeniul de *p*H cuprins între 3 și 9.

În condiții de reacție în general diferite de cele specifice mediului fiziologic, griseofulvina poate suferi o serie de transformări datorate reactivității structurii spiranice, cumaranice și a substituenților grefați pe cele trei nuclee.

Reactivitatea grupei metoxi din poziția 2' determină transformarea griseofulvinei într-un enol sau o dicetonă, prin tratare cu acid clorhidric în metanol sau cu soluții diluate de hidroxizi.

Hidroliza alcalină, în prezența soluțiilor concentrate de hidroxizi, conduce la decarboxilarea moleculei și transformarea structurii spiranice într-o structură triciclică condensată.

Griseofulvina poate fi oxidată cu permanganat de potasiu, obținându-se acidul 3-clor-4,6-dimetoxisalicilic, precum și cu acid cromic sau anhidridă cromică, formându-se 2-metoxi-6-metilchinona.

Prin reducere catalitică, griseofulvina se transformă într-un derivat de benzofenonă.

Clorurarea moleculei de griseofulvină în mediu organic poate conduce la produși mono- sau disubstituiți în nucleul C.

Dintre cele două grupe carbonil, numai cea din poziția 4' este reactivă, dând reacții specifice cetonelor.

Pe lângă structură și proprietăți fizico-chimice, griseofulvina se deosebește de antibioticele de origine fungică și prin proprietățile biologice, respectiv prin acțiunea sa antimicotică sistemică, în special asupra tulpinilor de *Trycophyton, Microsporum* și *Achoron*. Ca urmare, griseofulvina este utilizată în tratamentul dermatofițiilor regiunilor păroase ale pielii capului și feței.

10.3.2. Tehnologia de obținere a griseofulvinei

Deși griseofulvina se poate obține și prin metode chimice, acestea nu se aplică la nivel industrial deoarece sunt costisitoare și complicate în plus și de faptul că prin sinteză chimică antibioticul se obține sub formă de amestec racemic, ceea ce presupune etape suplimentare de separare a izomerului optic biologic activ.

Procedeul de biosinteză a griseofulvinei este mult mai avantajos din punct de vedere economic, el realizându-se pe baza unei tehnologii asemănătoare celei aplicate în cazul penicilinelor, prin cultivarea unor tulpini de fungi ca: *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium urticae*, *Penicillium patulum* sau *Penicillium sclerotigenum* [Vencata Dasu V., 1996].

Ca surse de carbon și energie pentru dezvoltarea biomasei și biosinteza antibioticului se folosesc glucide ca: glucoză, fructoză, lactoză sau amidon.

În compoziția mediilor nutritive utilizate pentru producerea griseofulvinei se folosește de cele mai multe ori extractul de porumb ca sursă principală de azot, datorită faptului că acesta conține și vitamine care stimulează biosinteza antibioticului. Conținutul în sursa de azot se reglează în funcție de natura sursei de carbon.

Mediile de cultură specifice biosintezei griseofulvinei conțin de asemenea săruri de calciu și fosfați, de obicei sub formă de carbonat de calciu și respectiv fosfat monopotasic, care influențează dezvoltarea masei celulare și limitează variația *p*H-ului în domeniul 6,5–7,5.

Fermentația se realizează în condiții de agitare și aerare, la temperatura de 25°C și se desfășoară pe o durată mare (12–14 zile).

Deoarece spre deosebire de peniciline, griseofulvina se găsește în finalul fermentației în miceliu, bioprocesul trebuie oprit înainte de atingerea stadiului de autoliză.

Procesarea post-biosinteză a mediului final de fermentație începe cu filtrarea miceliului (operație dificilă datorită structurii și consistenței acestuia), care se efectuează după un tratament termic de 5–10 minute la 60°C. După filtrare, masa celulară se usucă la 70...80 °C și se macină cu ajutorul unor utilaje adecvate (mori cu bilă sau micropulverizatoare), pregătindu-se astfel pentru etapa următoare, care constă în extracția griseofulvinei în solvenți organici. În acest scop se folosesc diclormetanul sau dicloretanul, care corespund criteriilor de selectivitate și solubilitate și se utilizează de obicei în proporție de 25% față de greutatea biomasei umede. Extracția se realizează în general în coloane, în contracurent, până la epuizarea conținutului de griseofulvină din miceliu.

Soluția organică de griseofulvină, rezultată în urma extracției, se concentrează, apoi se răcește la 5...10 °C și se tratează cu un „nesolvent" miscibil cu extractantul, de obicei benzină de extracție, care are proprietatea de a precipita antibioticul, sub formă de produs brut, cu un conținut de 90–98%.

Purificarea griseofulvinei brute se efectuează prin dizolvare în dicloretan, decolorare cu cărbune activ și reprecipitare cu benzină. Produsul final rezultat în urma acestui tratament și după uscare la 50...60 °C atinge o puritate de peste 99,5%.

În aceste condiții se poate obține un randament global de izolare – purificare a griseofulvinei de 80–85 %.

10.4. ANTIBIOTICE AMINOGLICOZIDICE

Din această familie de antibiotice, descoperite, ca și penicilinele, în deceniul al cincilea al secolului al XX-lea, fac parte substanțe al căror element structural comun constă într-o secvență amino- sau guanino-glicozidică, constând într-un aminociclitol de care se leagă, prin punți glicozidice, 2 sau mai rar 3 molecule de hexoze sau pentoze, purtătoare ale unor substituenți precum grupe hidroxil sau bazice. În consecință, aminoglicozidele sunt molecule polare și policationice.

În funcție de natura aminocliclitolului și a glucidelor substituite pe care le conțin, se cunosc mai multe antibiotice aminoglicozidice naturale, printre care se numără: streptomicina, neomicinele și paromomicinele, kanamicinele A, B și C, tobramicina, gentamicinele B și C, sisomicina.

Derivații biologic activi ai aminoglicozidelor naturale, obținuți prin semisinteză, sunt mult mai puțin numeroși decât cei ai penicilinelor.

Toate antibioticele aminoglicozidice sunt substanțe cu caracter bazic, solubile în apă și reacționează cu acizii formând săruri cristaline.

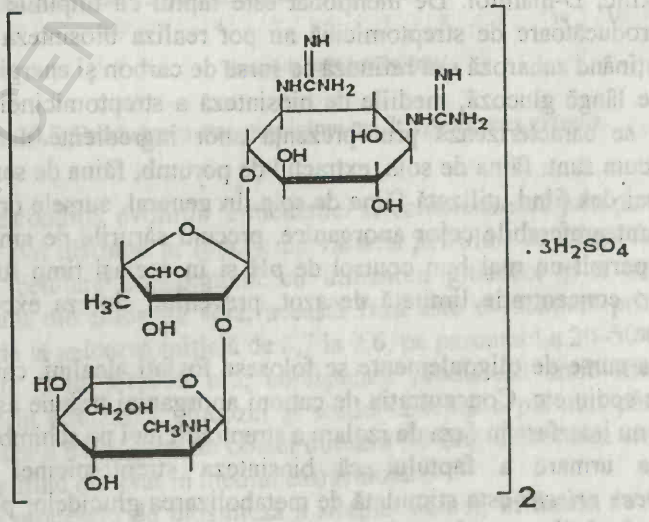
Activitatea antibacteriană a acestor antibiotice se datorează proprietății lor de a inhiba sinteza proteinelor bacteriene. Ele acționează la suprafața fracțiunii ribozomale 30S, combinându-se specific cu diferite proteine din această zonă; ca urmare, moleculele de ARN mesager se vor plasa incorect pe fracțiunea ribozomală

30S, iar mesajul de pe anticodon va fi incorect citit, determinând aşezarea ulterioară necorespunzătoare a complexului aminoacil-ARN de transport, ceea ce se traduce prin sinteza unei polipeptide cu secvenţe anormale, deci nefuncţională. Streptomicina induce de asemenea o încetinire a mişcării de „rostogolire" a ribozomului de-a lungul moleculei de ARN mesager, de unde citirea exclusivă a unui singur mesaj, cel înscris în primul codon.

10.4.1. Streptomicina

Importanţa terapeutică a streptomicinei, datorată în primul rând activităţii sale bactericide asupra bacilului Koch dar şi asupra altor bacterii Gram-pozitive, Gram-negative şi acido-rezistente, face ca acest antibiotic să se situeze pe locul al doilea, după penicilina G, în ceea ce priveşte volumul producţiei industriale la nivel mondial.

Din punct de vedere al structurii chimice, streptomicina este un glicozid al cărui aglicon poartă numele de streptidină. Streptidina este un derivat guanidinic al inozitolului şi anume al scilo-inozitolului (izomerul ce conţine toate grupele hidroxil în poziţia *trans*). În molecula streptomicinei, streptidina este legată α-glicozidic de o dizaharidă, denumită streptobiozamină. Aceasta este formată dintr-o metil-pentoză neobişnuită, L-streptoza, legată α-glicozidic de N-metil-L-glucozamina. În general, în timpul proceselor de fermentaţie cu microorganismele producătoare de streptomicină, în anumite stadii ale biosintezei, streptomicina se poate lega α-glicozidic de o moleculă de D-manoză, formându-se astfel manozidostreptomicina (streptomicina B).



Sulfat de streptomicină

BCU IAŞI / CENTRU CARTE / LIBRARY

10.4.1.1. Proprietăţi fizico-chimice

Streptomicina este o substanţă solidă, cristalină, de culoare albă, care prezintă activitate optică. Este solubilă în apă şi greu solubilă în solvenţi ca: acetonă, eter, cloroform.

Streptomicina poate fi modificată chimic, la nivelul restului de streptoză, prin următoarele tipuri de reacţii:

a) hidroliză alcalină, cu transformarea streptozei într-o gama-pironă;

b) reducere catalitică sau electrochimică a grupei formil, cu formarea **dihidrostreptomicinei,** care se poate obţine şi direct, prin biosinteză în culturi de *Streptomyces humidus*;

c) hidrogenare în mediu acid (*p*H = 2), cu transformarea grupei formil în grupă metilol şi reducerea grupei hidroxil, obţinându-se **neodihidrostreptomicina**;

d) oxidarea grupei metil la grupă metilol, cu formarea **oxi-streptomicinei,** care se poate obţine şi direct, prin biosinteză în culturi de *Streptomyces griseocarneus* sau *Streptomyces subrutilus*.

10.4.1.2. Biosinteza

Pentru biosinteza streptomicinei se folosesc tulpini de *Streptomyces griseus* a căror productivitate este influenţată, pe de o parte, de caracteristicile genetice şi pe de altă parte, de utilizarea unei compoziţii adecvate a mediului de cultură [Norimasa T., 2003].

Având în vedere că toate unităţile structurale specifice streptomicinei derivă de la glucoză, este evident că mediile de fermentaţie utilizate pentru biosinteza acestui antibiotic trebuie să conţină glucoză, deşi tulpinile de *Streptomyces griseus* pot utiliza în faza de creştere şi alte mono-, di-, sau poliglucide (fructoză, galactoză, xiloză, lactoză, maltoză, amidon) sau un alcool polihidroxilic, D-manitol. De menţionat este faptul că tulpinile de *Streptomyces griseus* producătoare de streptomicină nu pot realiza biosinteza antibioticului în medii conţinând zaharoză sau rafinoză ca surse de carbon şi energie.

Pe lângă glucoză, mediile de biosinteză a streptomicinei folosite la nivel industrial se caracterizează prin prezenţa unor ingrediente naturale, bogate în proteine, cum sunt: făina de soia, extractul de porumb, făina de seminţe de bumbac etc, cel mai des fiind utilizată făina de soia. În general, sursele organice complexe de azot sunt preferabile celor anorganice, precum sărurile de amoniu sau nitraţii, deoarece permit un mai bun control de *p*H şi în acelaşi timp furnizează în mod continuu o concentraţie limitată de azot, prevenind sinteza excesiv de rapidă a proteinelor.

Ca surse de oligoelemente se folosesc fosfaţi alcalini, carbonat de calciu, clorura de sodiu etc. Concentraţia de cationi anorganici trebuie astfel reglată încât aceştia să nu interfere în faza de izolare a streptomicinei pe schimbători de ioni.

Ca urmare a faptului că biosinteza streptomicinei în celulele de *Streptomyces griseus* este stimulată de metabolizarea glucidelor pe calea oxidativă a pentozo-fosfaţilor, productivitatea tehnologiei de biosinteză depinde în mare

măsură de respectarea următoarelor condiții referitoare la compoziția mediului de cultură și parametrii de bioproces:

– prezența glucozei în concentrație adecvată dar nu excesivă;

– asigurarea unei concentrații adecvate de fosfor anorganic, în funcție de faza de fermentație: creșterea biomasei sau elaborarea antibioticului (40 – 120 μg/ml);

– asigurarea în mod continuu a unor concentrații limitate de azot disponibil, pentru evitarea sintezei proteice cu viteză excesivă;

– aerare bună;

– menținerea *p*H-ului în domeniul 7–8;

– menținerea temperaturii în intervalul 27…29 °C.

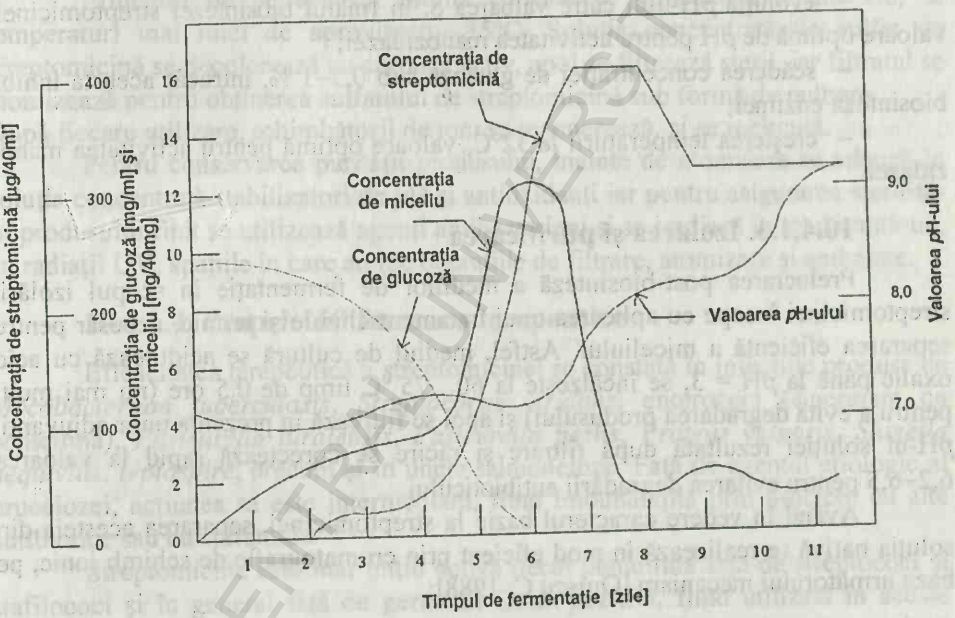


Fig. 10.5. Producerea streptomicinei cu *Streptomyces griseus*.

În aceste condiții, evoluția fermentației se caracterizează prin parcurgerea a trei faze care se pot distinge în funcție de variația *p*H-ului. În prima fază are loc creșterea masei celulare concomitent cu utilizarea glucozei și a azotului din amoniacul eliberat din făina de soia; această fază este evidențiată prin creșterea lentă a *p*H-ului de la valoarea inițială de 6,7 la 7,6, pe parcursul a 20–50 ore. Faza a doua, care poate dura 50–100 ore, corespunde producerii antibioticului și se caracterizează prin epuizarea glucozei și scăderea lentă a *p*H-ului până în jurul valorii 6,7. În faza a treia, care de obicei durează 20 ore, elaborarea antibioticului încetează, acesta fiind eliberat în mediul extracelular.

În toate procesele de biosinteză a streptomicinei, în fazele de început ale fermentației are loc și formarea de manozidostreptomicină. Întrucât manozido-

streptomicina are doar 20% din activitatea antibacteriană a streptomicinei, se urmăreşte ca aceasta să nu depăşească 10% din cantitatea de streptomicină din finalul fermentaţiei. Pentru transformarea prin scindare hidrolitică a manozido-streptomicinei în streptomicină, este necesară asigurarea anumitor parametri de bioproces care corespund activităţii unei enzime specifice, manozidaza. Aceste condiţii, care nu pot fi îndeplinite în totalitate decât în finalul fermentaţiei, sunt următoarele:

– limitarea conţinutului în metale grele, care sunt inhibitori ai manozidazei;

– asigurarea unei aerări adecvate, această enzimă fiind inhibată de aerarea deficitară;

– evoluţia *p*H-ului către valoarea 8, în finalul biosintezei streptomicinei, valoare optimă de *p*H pentru activitatea manozidazei;

– scăderea concentraţiei de glucoză sub 0,5–1 %, întrucât aceasta inhibă biosinteza enzimei;

– creşterea temperaturii la 32°C, valoare optimă pentru activitatea manozidazei.

10.4.1.3. Izolarea şi purificarea

Prelucrarea post-biosinteză a mediilor de fermentaţie în scopul izolării streptomicinei începe cu aplicarea unui tratament chimic şi termic, necesar pentru separarea eficientă a miceliului. Astfel, mediul de cultură se acidulează cu acid oxalic până la *p*H = 3, se încălzeşte la 60...75 °C timp de 0,5 ore (nu mai mult, pentru a evita degradarea produsului) şi apoi se filtrează în prezenţa unor adjuvanţi. *p*H-ul soluţiei rezultată după filtrare şi răcire se corectează rapid la valoarea 6,2–6,5 pentru evitarea degradării antibioticului.

Având în vedere caracterul bazic la streptomicinei, separarea acesteia din soluţia nativă se realizează în mod eficient prin cromatografie de schimb ionic, pe baza următorului mecanism [Oniscu C, 1988]:

$$\text{Str.}-NH_2 + HOH \rightarrow \text{Str.}-NH_3^+HO^-$$

$$\textit{Cationit}—COO^- Na^+ + \text{Str.}-NH_3^+HO^- \rightarrow \textit{Cationit}-COO^- NH_3^+-\text{Str.} + NaOH$$

Într-o primă etapă cationul streptomicinei este reţinut pe un cationit slab acid, conţinând grupe carboxilice.

Practic, această operaţie se efectuează într-o baterie de coloane încărcate cu cationit activat parţial în forma Na^+. Prima coloană dintr-o astfel de baterie este considerată saturată când conţinutul de streptomicină din efluent ajunge la 80% din valoarea iniţială, de la intrarea în coloană. Efluentul de pe o coloană este trecut pe coloana următoare, până când se realizează fixarea pe cationit a întregii cantităţi de streptomicină din soluţia nativă. Coloanele se scot din circuit pe măsură ce se saturează şi se pregătesc pentru eluţia streptomicinei, prin spălare cu apă dedurizată, înainte şi după sterilizare cu formol.

În a doua etapă a cromatografiei de schimb ionic, se realizează eluția streptomicinei cu soluție de acid sulfuric 4–5 %. Astfel se obține un eluat cu *p*H = 4–4,5, conținând sulfat de streptomicină.

Pentru purificarea streptomicinei separată din soluția nativă se folosește în continuare cromatografia de schimb ionic.

În prima treaptă de purificare, se reține excesul de ioni sulfat cu ajutorul unui anionit slab bazic.

În treapta a doua de purificare, soluția de sulfat de streptomicină neutralizată, care conține impurități organice și săruri minerale, este trecută peste o coloană conținând un cationit puternic acid, care are rolul de a reține bazele organice, compușii pirogeni și ionii metalici.

Efluentul de pe această ultimă coloană se concentrează sub vid, la temperaturi mai mici de aproximativ 35°C. Soluția concentrată de sulfat de streptomicină se decolorează cu cărbune activ, apoi se filtrează steril, iar filtratul se atomizează pentru obținerea sulfatului de streptomicină sub formă de pulbere.
După fiecare utilizare, schimbătorii de ioni se regenerează. și se recirculă.

Pentru conservarea purității produsului, înainte de atomizare se adaugă în soluția concentrată stabilizatori de *p*H și antioxidanți iar pentru asigurarea sterilității produsului finit se utilizează agenți antibacterieni și se iradiază în mod continuu, cu radiații UV, spațiile în care au loc operațiile de filtrare, atomizare și ambalare.

10.4.1.4. Proprietăți farmaco-terapeutice

Eficacitatea terapeutică a streptomicinei se constată în infecțiile produse de *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococus viridans*, enterococi (sinergism cu penicilina), *Pasteurella turalensis*, *Pasteurella pestis*, *Proteus vulgaris*, *Shigella aequivilis*, *leptospire*, precum și în unele salmoneloze. Față de agentul etiologic al brucelozei, acțiunea sa este intermediară, fiind îmbunătățită prin asociere cu alte antibiotice sau cu sulfamide.

Streptomicina este mai puțin activă decât penicilina față de streptococi și stafilococi și în general față de germenii Gram-pozitivi, fiind utilizată în aceste infecții numai în cazul în care germenii au devenit penicilino-rezistenți; este însă mai activă decât penicilina față de germenii Gram-negativi. Streptomicina este foarte puțin eficientă împotriva germenilor anaerobi sporulați.

Rezistența la streptomicină se instalează mai ușor și apare mai des decât penicilino-rezistența. Germenii deveniți streptomicino-rezistenți pot rămâne sensibili la acțiunea altor antibiotice sau a unor chimioterapice antibacteriene de sinteză.

Streptomicina se utilizează în toate formele de tuberculoză, asociată cu alte tuberculostatice, pentru a evita dezvoltarea rezistenței. De asemenea, acest antibiotic este indicat în septicemii și/sau endocadite cu *Streptococus viridans* sau enterococi (în asociere cu tetracicline)

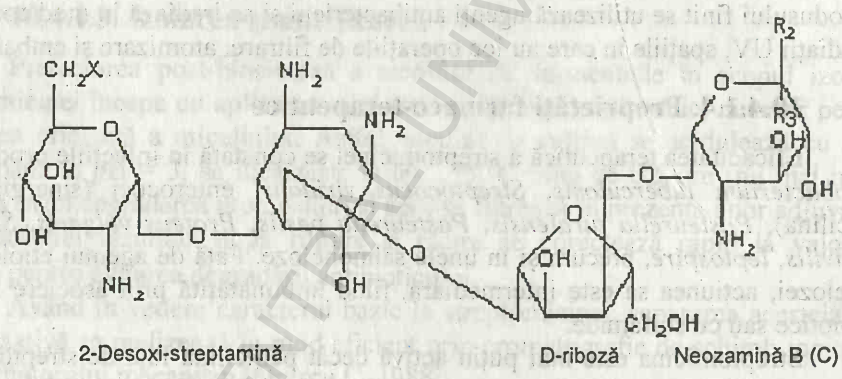
Se administrează intravenos, intramuscular, dar și per os, când acționează local, nefiind degradată de secrețiile digestive și se elimină ca atare, nefiind absorbită din intestin.

Pentru om, streptomicina prezintă oto- şi nefrotoxicitate, provocând tulburări de obicei reversibile, care sunt favorizate de dozele mari, prelungite, precum şi de vârsta înaintată. Este contraindicată în afecţiunile renale cronice, când nu se elimină la timp din organism şi pericolul de intoxicare creşte şi de asemenea în primele 5 luni de sarcină. Dozele maxime obişnuite sunt: 1g/zi şi 3g/cură, când nu afectează negativ organismul.

Pentru animale, streptomicina este mai puţin toxică decât pentru om, dar oricum mai toxică decât penicilina: la cabaline se constată o diminuare trecătoare a apetitului şi o accelerare a pulsului, iar la câini se constată uneori stări de nelinişte, tremurături musculare şi somnolenţă.

10.4.2. Neomicine şi paromomicine

Aceste antibiotice aminoglicozidice sunt produse de biosinteză ale unor actinomicete ca *Streptomyces fradiae* (neomicina) şi *Streptomyces rimosus* (paromomicina). Ele se obţin în urma proceselor de fermentaţie, sub forma unor amestecuri de molecule cu structuri foarte asemănătoare:



Denumirea	X	R_2	R_3
Neomicină B	NH_2	H	CH_2NH_2
Neomicină C	NH_2	CH_2NH_2	H
Paromomicină I	OH	H	CH_2NH_2
Paromomicină II	OH	CH_2NH_2	H

Componenta structurală specifică neomicinelor este 2,6-desoxi-2,6-diamino-glucoza, care poate fi prezentă sub forma a doi enantiomeri, prin care se diferenţiază neomicina B de neomicina C. Din mediile de cultură ale *Streptomyces fradiae* s-a izolat şi neomicina A, foarte puţin activă, a cărei structură corespunde produsului de hidroliză a neomicinelor B şi C.

Componenta structurală specifică paromomicinelor este 2-desoxi-2-aminoglucoza (D-glucozamina), care de asemenea poate fi prezentă sub forma a doi enantiomeri, prin care se diferenţiază paromomicina I de paromomicina II.

Elementul comun al structurii neomicinelor şi paromomicinelor este reprezentat de alte două molecule unite printr-o legătură α-glicozidică şi anume 2-desoxistreptamina şi D-riboza.

Dintre aceste antibiotice, cel mai activ este neomicina B, care de altfel are şi cele mai numeroase aplicaţii terapeutice.

Neomicina B este o substanţă care se prezintă sub forma de pulbere amorfă sau cristalină, cu p.t. = 225...226 °C. Sărurile acesteia cu acizi minerali sunt solubile în metanol diluat.

Tehnologia de obţinere a neomicinei este asemănătoare celei aplicate pentru Streptomicină, cu deosebirea că pentru izolarea neomicinei se foloseşte atât metoda cromatografiei de schimb ionic, cât şi metoda cromatografiei de adsorbţie. Astfel, prelucrarea post-biosinteză a filtratului rezultat după îndepărtarea miceliului include următoarele faze [Park Y.S., 1994]:

1) cromatografie de adsorbţie:
   - fixarea neomicinei pe o răşină adsorbantă;
   - eluţia neomicinei bază cu soluţie amoniacală 10%;
2) cromatografie de schimb ionic:
   - sorbţia neomicinei bază pe un cationit;
   - eluţia cu HCl sau H_2SO_4 diluat a neomicinei, sub formă de sare;
3) concentrare sub vid;
4) purificare prin decolorare cu cărbune activ;
5) atomizare.

Acţiunea farmaco-terapeutică a neomicinei se caracterizează prin proprietăţile bactericide ale acesteia în special faţă de bacilii Gram-negativi (colibacili, shigele, salmonele, *Proteus*, *Pseudomonas),* precum şi faţă de unii coci Gram-pozitivi. Neomicina este inactivă faţă de cocii Gram-negativi. Administrată pe cale bucală are acţiune predominant locală (la nivelul tubului digestiv). Rezistenţa la neomicină se dezvoltă lent. Neomicina este sinergică cu streptomicina, bacitracina şi eritromicina.

Condiţionat sub formă de comprimate sau unguente, sulfatul de neomicină se comercializează sub denumirea de Negamicină, de uz intern – pentru sterilizarea aparatului digestiv în diareei infecţioase şi în faze preoperatorii – şi extern, pentru aplicaţii topice în plăgi, arsuri, furunculoze, infecţii oculare. În asociere cu bacitracina, sulfatul de neomicină se comercializează ca unguent, sub denumirea de Negamicin B, produs cu spectru larg de acţiune, utilizat în piodermite, impetigo, eczeme uscate infectate etc.

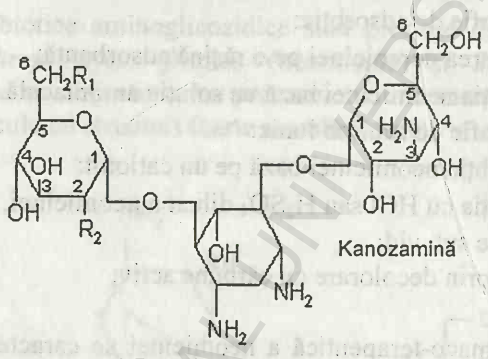
Neomicina este oto- şi nefrotoxică şi nu se asociază sau se asociază cu prudenţă cu alte antibiotice aminoglicozidice administrate sistemic.

Paromomicina se foloseşte aproape exclusiv, pe cale orală, în tratamentul amoebiazei intestinale.

10.4.3. Kanamicine

Ca şi neomicinele, kanamicinele se obţin prin biosinteză sub formă de amestecuri de molecule cu structuri asemănătoare. Ele sunt produse de *Streptomyces kanamyceticus* în al cărui mediu de cultura s-au evidenţiat trei structuri A, B şi C, care se diferenţiază semnificativ prin toxicitate şi nesemnificativ prin anumite elemente structurale.

Kanamicina B este cea mai toxică. Kanamicinele au două elemente structurale comune şi anume o amină caracteristică, denumită kanosamina (3-D-glucozamina) şi 2-desoxi-streptamina (ca şi neomicinele), diferenţiindu-se prin cel de-al treilea component structural, care poate fi 2,6-desoxi-2,6-diamino-D-glucopiranoza (kanamicina B), 2- sau 6-D-glucozamina (kanamicina C şi respectiv A).



Denumirea	R_1	R_2	Amina caracteristică
Kanamicină A	NH_2	OH	6-D-glucozamină
Kanamicină B	NH_2	NH_2	2,6-desoxi-2,6-diamino-D-glucopiranoză
Kanamicină C	OH	NH_2	2-D-glucozamină

Din amestecul celor trei kanamicine rezultate în urma proceselor de biosinteză se separă în final un produs ce conţine 98% Kanamicină A, prin procedee cromatografice asemănătoare celor aplicate în cazul streptomicinei, în care se ţine cont însă de bazicitatea mai redusă a kanamicinei.

Kanamicina bază se prezintă sub forma unei pulberi cristaline, cu p.t. = 170°C, solubilă în apă, greu solubilă în cloroform şi alcool izopropilic şi insolubilă în solvenţi nepolari. Poate fi degradată de către unii germeni kanamicino-rezistenţi, prin acetilarea grupei amină a glucozaminei.

Acţiunea farmaco-terapeutică a kanamicinei se caracterizează prin efectul bactericid în special asupra bacililor Gram-negativi (*E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia tuberculosis*) şi prin sinergism cu peniciline şi cefalosporine. Se foloseşte ca antibiotic de atac în majoritatea

septicemiilor şi ca antibiotic de substituţie în caz de rezistenţă la antibioticele uzuale. Este indicat în infecţii renale, urinare, genitale, endocardite, meningite, infecţii respiratorii, stafilococii cutanate maligne ale feţii şi în tuberculoza cu bacili Koch rezistenţi la tuberculostaticele uzuale.

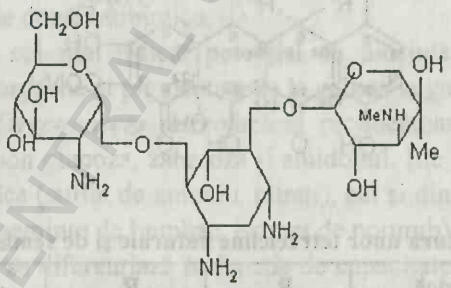
Aplicarea kanamicinei este limitată, ca şi în cazul streptomicinei, de oto- şi nefro-toxicitatea care o caracterizează, astfel încât doza maximă administrabilă nu trebuie să depăşească 15 mg/kg/zi şi 15 g ca doză totală.

Se comercializează sub formă de flacoane cu 1 g sulfat de kanamicină pentru soluţii injectabile sau sub formă de unguent oftalmic 1%.

10.4.4. Gentamicina

Acest antibiotic se obţine ca metabolit secundar al unor bacterii sporogene, din genul *Micromonospora* sau *Mechinospora.* În mediul de cultivare a microorganismelor producătoare s-au evidenţiat mai multe produse cu structură amino-glicozidică asemănătoare, între care gentamicina A se găseşte în cantităţile cele mai mari, fiind şi cea mai activă.

În structura gentamicinei A se întâlnesc următoarele componente unite prin legături glicozidice: 2-D-glucozamina, 2-desoxi-streptamina şi o osamină caracteristică, gentozamina.



2-D-glucozamină 2-Desoxi-streptamină Gentozamină

Gentamicina A bază este o substanţă care se prezintă sub formă de pulbere amorfă, cu p.t. = 108°C.

Se obţine printr-o tehnologie asemănătoare celei aplicate în cazul streptomicinei, cu deosebirea că izolarea sulfatului de Gentamicină A nu se realizează prin atomizare, ci prin precipitare cu acetonă sau eter etilic, iar purificarea produsului brut se realizează prin dizolvare în metanol, decolorare cu cărbune activ şi reprecipitare cu acetonă sau eter etilic.

Gentamicina este un antibiotic cu spectru larg de acţiune ce cuprinde coci şi bacili Gram-pozitivi şi Gram-negativi, inclusiv *Salmonella, Proteus, E. coli, Enterobacter*; mai puţini sensibili la Gentamicină sunt *Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis şi Pseudomonas aeruginosa.* Se utilizează în pielonefrită, pneumonii intraspitaliceşti, meningite cu bacili Gram-negativi, endocardita cu enterococi rezistenţi la streptomicină, arsuri infectate, blefaroconjunctivite, blefarită, ulcere corneene.

Se comercializează sub formă de sulfat sau clorhidrat de gentamicină, condiționate sub formă de soluții injectabile, oftalmice, creme și unguente și se administrează cu precauție datorită oto- și nefrotoxicității.

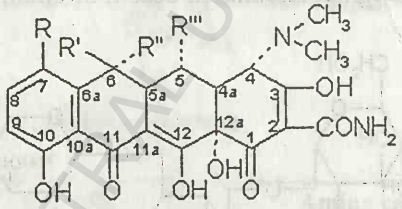
10.5. TETRACICLINE

Denumirea acestor antibiotice provine de la structura lor comună tetraciclică reprezentată de un nucleu naftacen-carboxamidic. Pe acest nucleu sunt grefați diferiți substituenți. Tetraciclinele prezintă un caracter amfipatic, datorat faptului că tetraciclul este hidrofob, iar anumiți substituenți sunt hidrofili. În funcție de timpul de înjumătățire, tetraciclinele se împart în două categorii:

– tetracicline de generația I: clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina;

– tetracicline de generația a II-a: doxiciclina, minociclina

Familia tetraciclinelor, antibiotice cu spectru larg de acțiune, cuprinde atât produse naturale, obținute exclusiv prin biosinteză, cât și produse de semisinteză, obținute prin modificări chimice ale tetraciclinelor naturale.



Tabelul 10.14

Structura unor tetracicline naturale și de semisinteză

Denumirea generică	R'''	R''	R'	R
Tetraciclină	H	Me	OH	H
Clortetraciclină	H	Me	OH	Cl
Oxitetraciclină	OH	Me	OH	H
Doxiciclină	OH	Me	H	H
Metaciclină	OH	$=CH_2$		H
Meclociclină	OH	$=CH_2$		Cl

10.5.1. Proprietăți fizico-chimice și biologice

Tetraciclinele sunt substanțe solide care se prezintă sub formă de pulberi cristaline, de culoare galbenă. Datorită structurii lor, prezintă benzi de absorbție caracteristice în UV, IR și spectre de fluorescență.

Proprietățile tetraciclinelor de a forma săruri cu acizi și cu baze (ca urmare a caracterului lor amfoter), precum și de a forma chelați cu ionii metalici sunt folosite pentru separarea, purificarea, identificarea și dozarea lor cantitativă. Pe proprietatea de a lega foarte ușor și stabil oligoelementele esențiale dezvoltării microorganismelor se bazează și mecanismul de acțiune împotriva agenților patogeni: prin formarea unor punți de magneziu, tetraciclinele împiedică atașarea moleculelor de ARN mesager pe suprafața fracțiunii ribozomale 30S și maschează situsul de pe fracțiunea ribozomală 50S de fixare a complexului aminoacil-ARN de transport.

Tetraciclinele sunt instabile în mediu bazic, acid sau oxidant, datorită reacțiilor de degradare care au loc la nivelul pozițiilor C_{10}–C_{12} și a reacțiilor de epimerizare la C_4. Sub formă de clorhidrați, tetraciclinele sunt mult mai solubile și mai stabile în timp, dar administrarea parenterală în această formă este dureroasă.

10.5.2. Obținerea tetraciclinelor naturale

La nivel industrial **tetraciclina** și **clortetraciclina** sunt produse de tulpini mutante de *Streptomyces aureofaciens* prin aplicarea unei tehnologii de fermentație care poate fi dirijată, prin compoziția mediului nutritiv, către biosinteza preponderentă a unuia din cele două antibiotice.

Mutantele cu cel mai ridicat potențial de biosinteză a clortetraciclinei formează colonii nesporogene și pigmentate de la galben la galben-portocaliu.

Tulpinile de *Streptomyces aureofaciens* producătoare de tetracicline pot utiliza ca surse de carbon glucoza, zaharoza și amidonul. Ele pot metaboliza azotul atât din surse anorganice (sulfat de amoniu, nitrați), cât și din surse organice (uree, făină de soia, făină de semințe de bumbac, extract de porumb).

Aceste tulpini se diferențiază în funcție de capacitatea de a utiliza ionii de Cl^- și Br^-. Unele dintre ele folosesc în totalitate ionii de Cl^- prezenți în mediu, pentru a produce clortetraciclină, alături de mici cantități de tetraciclină, iar în absența ionilor de Cl^- au capacitatea de a utiliza ionii de Br^-, producând bromtetraciclină. Astfel de tulpini nu pot utiliza însă ionii de Br^- atunci când în mediu există și ioni de Cl^-: în acest caz ele nu sintetizează bromtetraciclină și nici clortetraciclină, a cărei biosinteză e inhibată de prezența ionilor de Br^-, urmarea fiind creșterea randamentului de producere a tetraciclinei.

Un alt tip de tulpini mutante de *Streptomyces aureofaciens* se caracterizează prin incapacitatea de a utiliza ionii de Br^- pentru biosinteza bromtetraciclinei, prezența acestora conducând, în absența ionilor de Cl^-, la producerea unor cantități moderate de tetraciclină.

Cantitățile de tetraciclină și clortetraciclină produse prin fermentație sunt corelate în mod direct cu concentrația ionilor de Cl^-: de exemplu, tetraciclina poate

ajunge la 30% dacă ionii de Cl^- sunt prezenți în mediu la o concentrație de 1,7 mechiv/l și scade la 7,5% în prezența unei concentrații de ioni de Cl^- de 6,4 mechiv/l. Creșterea proporției de tetraciclină până la 90% se poate obține prin includerea în compoziția mediului de cultură a unor inhibitori de clorurare, cum sunt ionii de Br^- (0,8–48 mechiv/l), tiocianații sau liganzii capabili să complexeze Cu, metal esențial pentru activarea enzimelor care catalizează reacțiile de clorurare.

Oxitetraciclina este produsă de *Streptomyces rimosus*, care nu poate utiliza zaharoza ca sursă de carbon, ci doar glucoza, lactoza, glicerolul, maltoza și amidonul. Unele tulpini mutante, cu bioproductivitate ridicată, pot utiliza ca surse de carbon anumite uleiuri vegetale cum sunt uleiul de soia sau de alune [Farid M. A., 1994].

Microorganismele producătoare de oxitetraciclină folosesc aceleași surse de azot ca și *Streptomyces aureofaciens*.

Mediile de cultură utilizate pentru biosinteza tetraciclinelor sunt de regulă bogate în săruri minerale, între care cele de calciu și magneziu au o dublă funcție: ajută la reglarea *p*H-ului și contribuie la reducerea toxicității antibioticelor, prin saturarea capacității acestora de a lega microelemente esențiale.

Ca și în cazul streptomicinei, concentrația de fosfor influențează în mod esențial, producerea tetraciclinelor; din acest motiv, cantitatea de extract de porumb din mediu trebuie astfel stabilită încât să nu furnizeze fosfor în exces.

Procesele de fermentație pentru producerea tetraciclinelor se desfășoară în condiții optime la temperatura de 27±1°C, la *p*H = 6,5–6,8 (tetraciclina) sau 7 (clortetraciclina), în condiții de aerare și agitare sub o ușoară suprapresiune și durează 125–130 ore.

În finalul fermentației, mediul se răcește la 10...15 °C, se acidulează la *p*H = 1,5–2 și se filtrează rapid.

Filtratul poate fi prelucrat prin două procedee:

– cromatografie de adsorbție, în care tetraciclinele sunt fixate pe suporturi anorganice, apoi eluate cu solvenți polari și separate prin reținerea fracțiunilor fluorescente;

– precipitare sub formă de complecși insolubili cu ioni de calciu, după neutralizarea filtratului la *p*H = 7,7 cu soluție amoniacală. Formarea acestor complecși se datorează ionilor de calciu din $CaCO_3$, adăugat în mediile de cultură în proporție de 1%, pentru tamponarea acidității rezultate din fermentație. Complecșii insolubili ai tetraciclinei se separă prin filtrare de celelalte componente ale lichidului de fermentație, care, printre altele, conține și vitamina B_{12}; apoi se suspendă în apă și se tratează cu acid oxalic până la *p*H = 1,5–1,9, pentru precipitarea oxalatului de calciu și eliberarea tetraciclinei bază. Oxalatul de calciu se îndepărtează prin filtrare, iar separarea tetraciclinei bază din filtrat se realizează prin precipitare acesteia la *p*H = 4.

Tetraciclina bază se purifică prin extracție într-un amestec de metanol : acetat de butil (1:10). Extractul se concentrează și din soluția concentrată tetraciclina se poate separa sub forma bazică, prin precipitare cu apă demineralizată, sau sub formă de clorhidrat, prin tratare cu HCl concentrat.

10.5.3. Proprietăți farmaco-terapeutice ale tetraciclinelor naturale

Tetraciclinele naturale sunt antibiotice bacteriostatice, cu spectru larg de acțiune, cuprinzând germeni Gram-pozitivi și Gram-negativi aerobi și anaerobi: spirochete, micoplasme, rickettsii, chlamidii, unele protozoare și unii stafilococi, streptococi, pneumococi, *E. coli*, *Enterobacter*; *Klebsiella*, *H. influenzae*. Tulpinile de *Proteus*-indol pozitiv și majoritatea tulpinilor de *Proteus vulgaris* și *Pseudomonas aeruginosa* sunt rezistente.

Se utilizează în: bruceloză, holeră, tifos exantematic și alte rickettsioze, pneumonii, bronhopneumonii, bronșite cronice acutizate, tuse convulsivă, meningită, dizenterie microbiană, infecții urinare, sinuzite, otite, mastoidite, infecții oculare, piodermite etc.

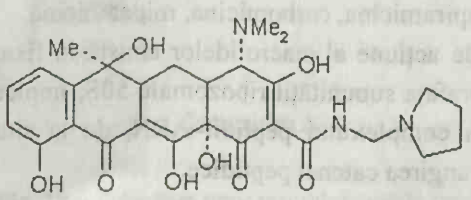
Se administrează oral, sub formă de baze sau clorhidrați și topic, sub formă de unguente. În cazul curelor prelungite, apare pericolul distrugerii florei intestinale și al infectării cu microorganisme insensibile la tetraciclină, de exemplu, fungi.

Administrarea parenterală a clorhidratului este dureroasă deoarece bazicitatea slabă a tetraciclinelor impune, pentru solubilizarea clorhidratului și asigurarea stabilității sale, o soluție de *p*H mai mic decât cel fiziologic. Administrarea trebuie să fie făcută lent și cu precauție, pentru a evitarea necrozelor locale.

10.5.4. Tetracicline de semisinteză

Tetraciclinele de semisinteză sunt superioare celor naturale din punct de vedere al solubilității în apă și din punct de vedere al intensității acțiunii antibacteriene.

Rolitetraciclina (*Solvocilin*) are un caracter bazic mult mai puternic decât tetraciclina, deoarece conține la azotul amidic o grupare metil-pirolidinică, puternic bazică.



Ca urmare, Rolitetraciclina bază este mult mai solubilă decât tetraciclina, iar clorhidratul său, de asemenea mult mai solubil decât tetraciclina clorhidrat, se întrebuinţează la prepararea de soluţii injectabile. Acestea se administrează în tratamente de şoc sau când administrarea orală este inoperantă (diaree şi vome energice).

O altă tetraciclină de semisinteză este **metaciclina** (6-dezoxi-6-metilen-5-hidroxi-tetraciclina), care este foarte eficientă în combaterea infecţiilor respiratorii prin doză unică, mai ales la copii, în cazuri de pneumonie. Este de asemenea eficientă în infecţii gastro-intestinale (febră tifoidă, salmoneloză, dizenterie bacilară), septicemii, precum şi în infecţii biliare şi urinare.

Doxiciclina, care se poate obţine din oxitetraciclină sau din metaciclină, are un spectru similar, dar este mai activă şi ca atare acţionează eficient în doze de aproximativ jumătate din cele ale tetraciclinei, iar durata de acţiune este cu mult mai mare decât a celorlalte tetracicline, depăşind 24 ore..

10.6. MACROLIDE ŞI CETOLIDE

Macrolidele sunt antibiotice care, din punct de vedere structural, se caracterizează prin prezenţa unui ciclu alifatic de dimensiuni mari ce conţine o grupă lactonă şi este legat glicozidic de două sau mai multe glucide, dintre care una este aminată. Prezenţa uneia sau chiar a două grupe amină conferă acestor antibiotice un caracter bazic. Majoritatea macrolidelor folosite în practica medicală au proprietăţi antibacteriene; există şi macrolide cu proprietăţi antifungice (macrolide polienice), dintre care cea mai des utilizată este nistatina.

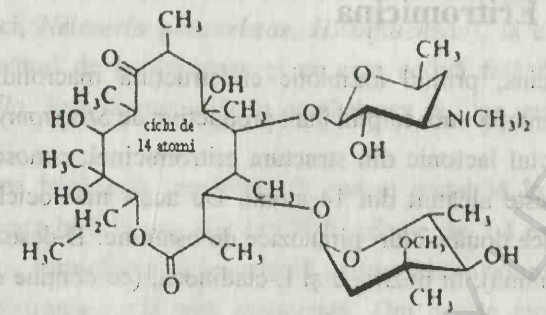
Macrolidele cunoscute până în prezent au macrociclul alcătuit dintr-un număr variind între 14 şi 16 atomi, după cum urmează [Blondeau J. M., 2002]:

– 14 atomi: eritromicina, oleandomicina, troleandomicina, roxitromicina, diritromicina, eritromicilamina, claritromicina (6-metoxi-eritromicina);

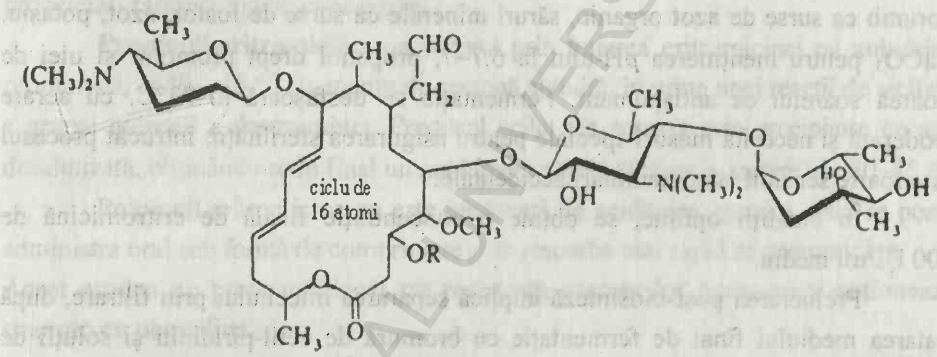
– 15 atomi: azitromicina;

– 16 atomi: spiramicina, carbomicina, miocamicina.

Mecanismul de acţiune al macrolidelor constă în fixarea lor pe situsul A (aminoacil) de pe suprafaţa subunităţii ribozomale 50S, împiedicând astfel fixarea şi implicit deplasarea complexului peptidil–ARN$_t$ de la situsul A la situsul P (peptidil), respectiv alungirea catenei peptidice.

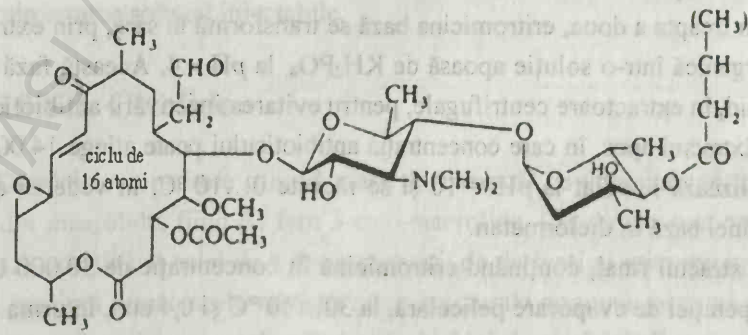


Eritromicina A



Spiramicina

I R = H
II R = $COCH_3$
III R = $COCH_2CH_3$



Carbomicina A

Fig. 10.6. Structura unor macrolide antibacteriene.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

10.6.1. Eritromicina

Eritromicina, primul antibiotic cu structură macrolidică descoperit, se obține prin fermentația unor tulpini înalt productive de *Streptomyces erythreus*.

Macrociclul lactonic din structura eritromicinei, cunoscut sub denumirea de eritronolidă, este alcătuit din 14 atomi. De acest macrociclu sunt legate prin legături glicozidice două cicluri piranozice de osamine: D-desozamina (ce conține o grupă dimetilamină), în poziția 5 și L-cladinoza, (ce conține o grupă metoxi) în poziția 3.

Mediile de cultură utilizate pentru biosinteza eritromicinei conțin amidon de cartofi și glucoză ca surse de carbon și energie, făină de soia și extract de porumb ca surse de azot organic, săruri minerale ca surse de fosfor, azot, potasiu, $CaCO_3$ pentru menținerea *p*H-ului la 6,7–7, propanol drept promotor și ulei de floarea soarelui ca antispumant. Fermentația se desfășoară la 33°C, cu aerare moderată și necesită măsuri speciale pentru asigurarea sterilității, întrucât procesul este foarte sensibil la contaminări accidentale.

În condiții optime, se obține o concentrație finală de eritromicină de 500 UI/ml mediu.

Prelucrarea post-biosinteză implică separarea miceliului prin filtrare, după tratarea mediului final de fermentație cu bromură de cetil-piridiniu și soluții de electroliți (NaCl și $CaCl_2$), la *p*H = 9,6, pentru coagularea proteinelor de balast.

Izolarea eritromicinei se realizează printr-un procedeu asemănător celui aplicat în cazul penicilinei, bazat pe extracție lichid-lichid în trepte. Astfel, eritromicina bază se extrage din filtrat, la *p*H = 9–10, prin tratarea acestuia cu acetat de butil. În acest mod, în extractul organic se poate realiza o concentrație de eritromicină cuprinsă între 5000–9000 UI/ml.

În treapta a doua, eritromicina bază se transformă în sare, prin extracție din soluția organică într-o soluție apoasă de KH_2PO_4, la *p*H = 4. Această fază se realizează rapid, în extractoare centrifugale, pentru evitarea inactivării antibioticului.

Extractul apos, în care concentrația antibioticului poate atinge 14 000 UI/ml, se neutralizează imediat la *p*H = 10 și se răcește 0...10 °C, în vederea extracției eritromicinei bază în diclormetan.

Extractul final, conținând eritromicină în concentrație de 30 000 UI/ml, se supune operației de evaporare peliculară, la 30...40 °C și 0,4 atm, în urma căreia se obține o soluție de 150 000–300 000 UI eritromicină/ml, din care antibioticul cristalizează lent, prin răcire la –10°C și se separă prin filtrare.

Eritromicina are un spectru de acțiune asemănător penicilinei G (streptococi, pneumococi, *Neisseria gonorrheae*, *H. influenzae*), la care se adaugă și stafilococii producători de penicilinaze și nu este activă față de *Pseudomonas*, *Proteus*, *Salmonella*. Este foarte utilă în combaterea bolilor venerice la bolnavi penicilino-alergici.

Eritromicina bază este insolubilă în apă și instabilă în mediu acid. La *p*H ≤ 6 este inactivată în 1–3 ore, dar la *p*H fiziologic de 7,4 este stabilă 24 ore la 37°C. Ca urmare, formularea farmaceutică pentru administrare parenterală este dificilă, iar administrarea orală este ineficientă. Din aceste motive s-a cercetat obținerea unor derivați ai eritromicinei care să nu prezinte dezavantajele susmenționate, descoperindu-se un număr de esteri și săruri ale eritromicinei care au proprietăți farmacologice superioare.

Propionil-eritromicina s-a obținut prin tratarea eritromicinei cu anhidridă propionică, la 10...15 °C, în mediu de acetonă anhidră, în urma unei reacții de aicilare a grupei hidroxil a desozaminei. Produsul acilat s-a separat prin precipitare cu apă desalinizată, obținându-se în final un randament global (acilare + izolare) de 80–85 %.

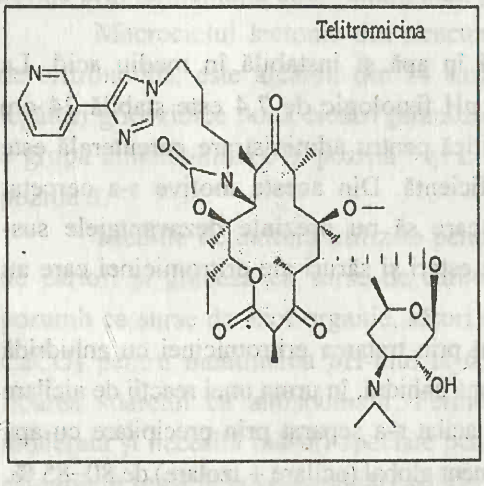
Propionil-eritromicina nu este inactivată de aciditatea gastrică, deci se poate administra oral sub formă de comprimate și se resoarbe mai rapid ca eritromicina. Acest produs nu provoacă decât rar rezistența germenilor patogeni și acționează sinergic cu penicilina.

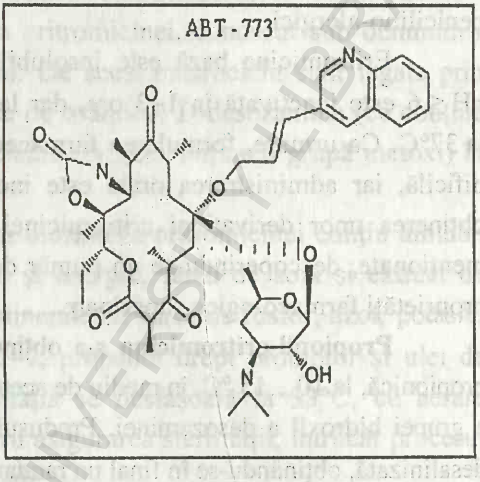
Etilsuccinatul de eritromicină se prepară prin acilarea grupei hidroxil din poziția 2' a eritromicinei sau propionil-eritromicinei cu hemiesterul succinic, în solvent organic. Pentru siropurile de uz pediatric se folosesc esteri emulsionabili, ca lauril-sulfatul și strearatul de dimetil-piranozil-amoniu. Pentru administrarea intravenoasă și intramusculară se folosesc ale eritromicinei. De exemplu, lactobionatul de eritromicină este foarte solubil în apă și acționează foarte rapid după administrarea soluției injectabile.

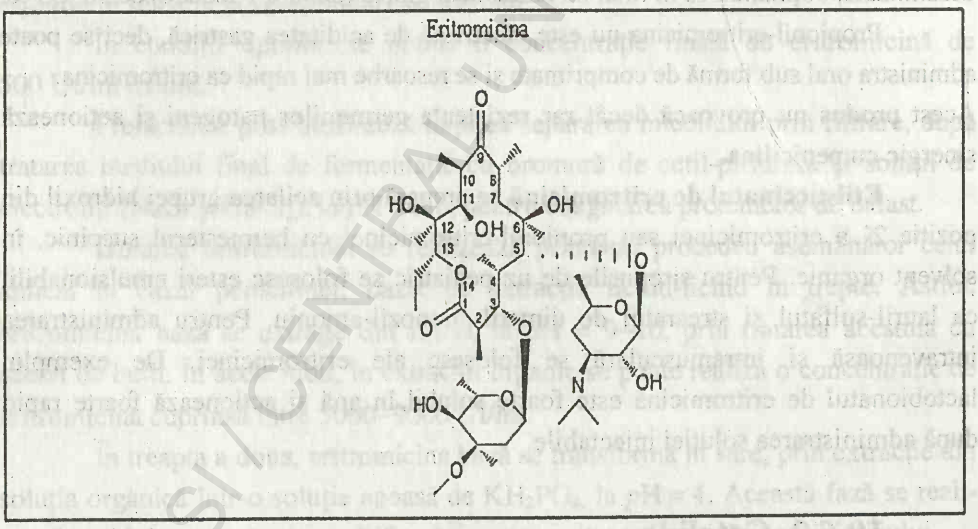
10.6.2. Cetolide

Cetolidele constituie o nouă clasă de compuși cu activitate antibacteriană derivați din macrolide, fiind de fapt 3-ceto-macrolide. Cetolidele sunt compuși de semisinteză aparținând celei de-a doua generații de derivați ai eritromicinei. Acești compuși prezintă următoarele caracteristici structurale comune: o grupă cetonă în poziția 3 a nucleului macrociclic, în locul glucidei de tip L-cladinoză, și o grupă metoxi în poziția 6, în locul grupei hidroxil. Cei mai cunoscuți reprezentanți ai

acestei noi clase de antibiotice sunt telitromicina sau HMR3647 (Aventis) şi compusul ABT-773 (Abbott), aflat încă in faza a IV-a de testare farmacologică clinică [Zhanel G. G, 2002].





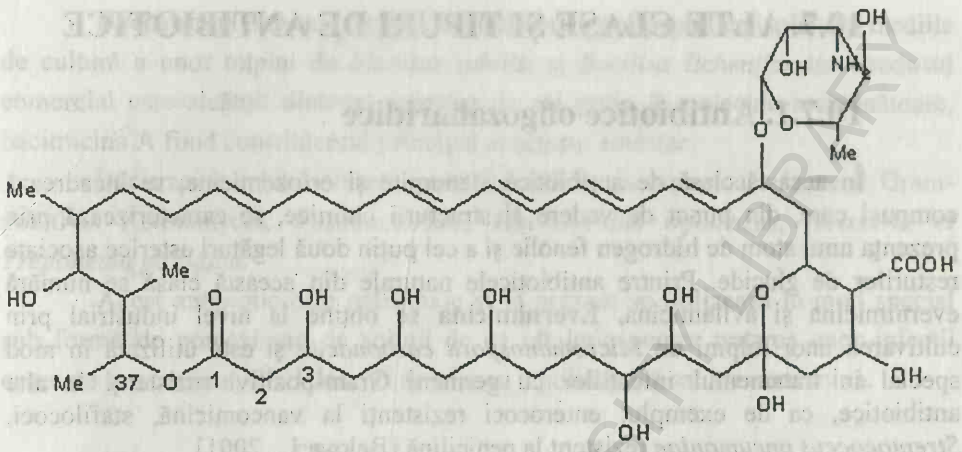


10.6.3. Nistatina

Nistatina este un antibiotic care se deosebeşte de ceilalţi reprezentanţi din familia macrolidelor prin acţiunea sa antifungică.

Macrociclul lactonic al nistatinei are o structură polienică, caracterizată prin prezenţa a 6 legături duble conjugate, de care se leagă o amină specifică, denumită micozamină.

LUCIAN BLAGA UNIVERSITY LIBRARY CENTRAL



Ca substanță activă, nistatina se prezintă sub forma unei pulberi de culoare galben-deschis, cu p.t =160°C (desc.). Este insolubilă în apă și solubilă în alcooli alifatici inferiori. Reactivitatea chimică a nistatinei este marcată de caracterul său puternic reducător.

Etapa de biosinteză din tehnologia de obținere a nistatinei parcurge fazele întâlnite în cazul tuturor antibioticelor. Ca microorganisme producătoare la nivel industrial se utilizează tulpini de *Streptomyces noursei* [Brautaset T., 2000]. În finalul fermentației, antibioticul se găsește în miceliu, din care se extrage cu metanol.

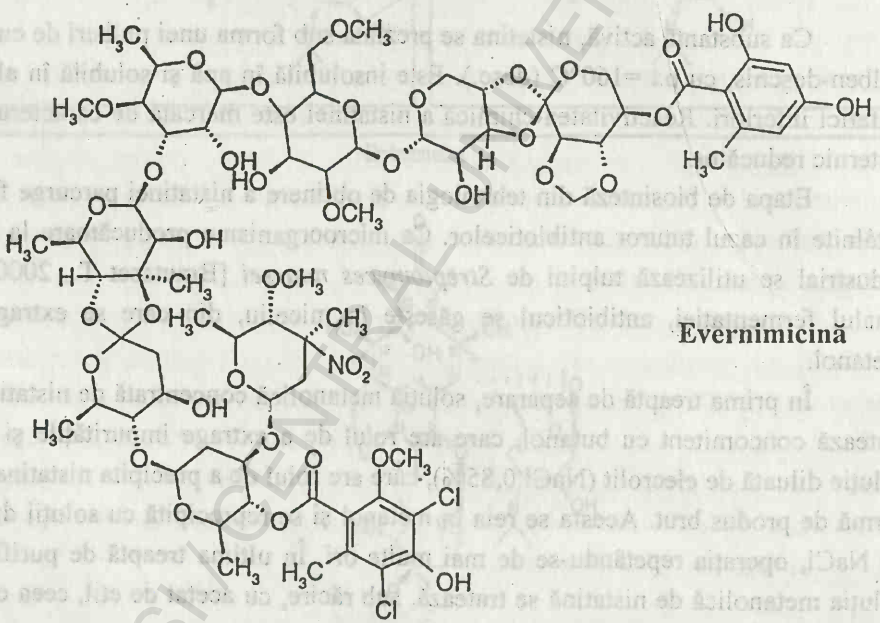
În prima treaptă de separare, soluția metanolică concentrată de nistatină se tratează concomitent cu butanol, care are rolul de a extrage impuritățile și cu o soluție diluată de elecrolit (NaCl 0,85%), care are rolul de a precipita nistatina, sub formă de produs brut. Acesta se reia în metanol și se reprecipită cu soluții diluate de NaCl, operația repetându-se de mai multe ori. În ultima treaptă de purificare, soluția metanolică de nistatină se tratează, sub răcire, cu acetat de etil, ceea ce are ca urmare precipitarea antibioticului purificat.

Nistatina este un antibiotic lipsit de toxicitate. Este foarte activă față de *Candida albicans*, dar acționează energic și asupra altor levuri (*Blastomyces, Tricophyton, Microsporon*). Se comercializează și sub denumirea Stamicin. Este indicată în tratamentul candidozelor bucofaringiene, intestinale și vaginale și se poate asocia antibioticelor cu spectru larg, administrate timp îndelungat. Ca uz veterinar, nistatina se folosește în tratamentul tricofiților.

10.7. ALTE CLASE ŞI TIPURI DE ANTIBIOTICE

10.7.1. Antibiotice oligozaharidice

În această clasă de antibiotice, denumite şi ortozomicine, se încadrează compuşi care, din punct de vedere al structurii chimice, se caracterizează prin prezenţa unui atom de hidrogen fenolic şi a cel puţin două legături esterice asociate resturilor de glucide. Printre antibioticele naturale din această clasă se numără evernimicina şi avilamicina. **Evernimicina** se obţine la nivel industrial prin cultivarea unor tulpini de *Micromonospora carbonacea* şi este utilizată în mod special în tratamentul infecţiilor cu germeni Gram-pozitivi rezistenţi la alte antibiotice, ca de exemplu: enterococi rezistenţi la vancomicină, stafilococi, *Streptococcus pneumoniae* rezistent la penicilină [Belova L., 2001].



Evernimicină

Avilamicina este un amestec de oligozaharide cu molecule asemănătoare din grupa ortozomicinelor, produs de *Streptomyces viridochromogenes,* care în prezent se utilizează în domeniul zoo-veterinar [Jung G., 2001].

10.7.2. Antibiotice peptidice

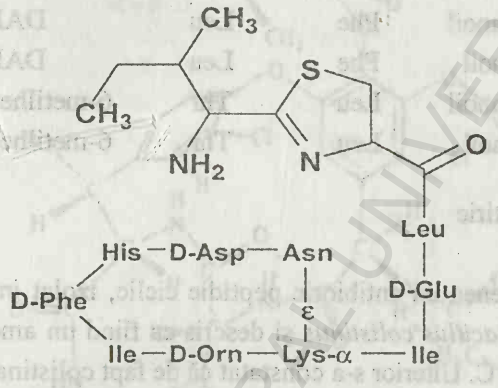
Cele mai cunoscute antibiotice peptidice sunt bacitracina, polimixinele şi colistina.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bacitracina este un complex de antibiotice polipeptidice izolat din mediile de cultură a unor tulpini de *Bacillus subtilis* şi *Bacillus licheniformis.* Produsul comercial este alcătuit dintr-un amestec de cel puţin 9 molecule asemănătoare, bacitracina A fiind constituentul principal al acestui amestec.

Bacitracina inhibă sinteza peretelui celular la numeroase bacterii Gram-pozitive: *Actinomyces, Fusobacterium, Haemophilus influenzae, Neisseria et Treponema pallidum.*

Acest antibiotic este nefrotoxic şi în prezent se utilizează în mod special sub formă de pomezi sau de soluţii de uz oftalmic pentru tratarea unor infecţii cutanate sau oculare, fiind deseori asociat cu o polimixină sau cu neomicina.



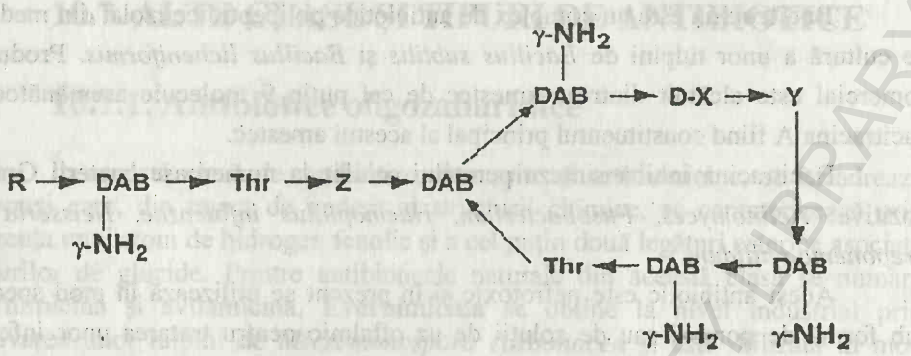
Bacitracină

Polimixinele sunt antibiotice peptidice ciclice care au fost izolate sub forma unor molecule cu structură asemătoare (polimixine A, B, C, D, E, F, K, M, P, S şi T) din mediile de cultură ale unor tulpini de *Bacillus polymyxa* începând din 1947.

În prezent numai polimixina B şi polimixina E (sau colistina) sunt utilizate în terapeutică.

Aceste antibiotice sunt active faţă de numeroase bacterii Gram-negative (*Bordetella, Enterobacter, Escherichia coli, Klebsiella, Pasteurella, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella, Shigella , Vibrio*).

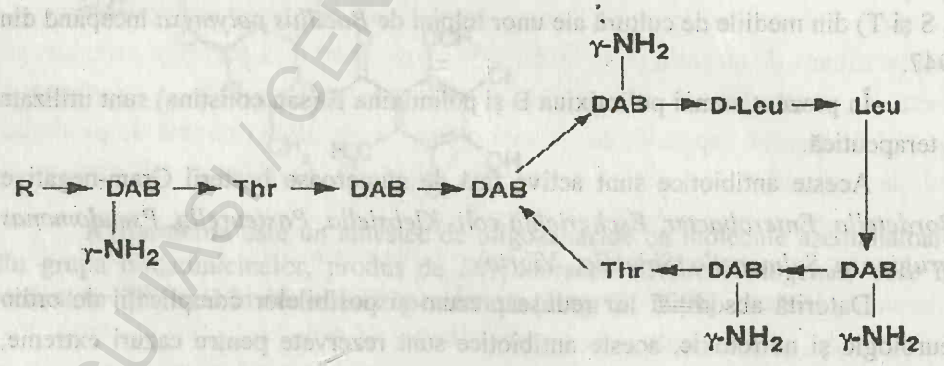
Datorită absorbţiei lor reduse precum şi posibilelor complicaţii de ordin neurologic şi nefrotoxic, aceste antibiotice sunt rezervate pentru cazuri extreme, reprezentate de infecţiile cu bacterii rezistente la toate celelalte antibiotice şi pentru administrarea topică (în tratamentul local al infecţiilor pielii, mucoaselor, ochilor şi urechilor).



Polimixina	R	X	Y	Z
B_1	(+)-6-metiloctanoil	Phe	Leu	DAB
B_2	6-metilheptanoil	Phe	Leu	DAB
D_1	(+)-6-metiloctanoil	Leu	Thr	6-metilheptanoil
D_2	6-metilheptanoil	Leu	Thr	6-metilheptanoil

DAB = acid L- α,β – diaminobutiric

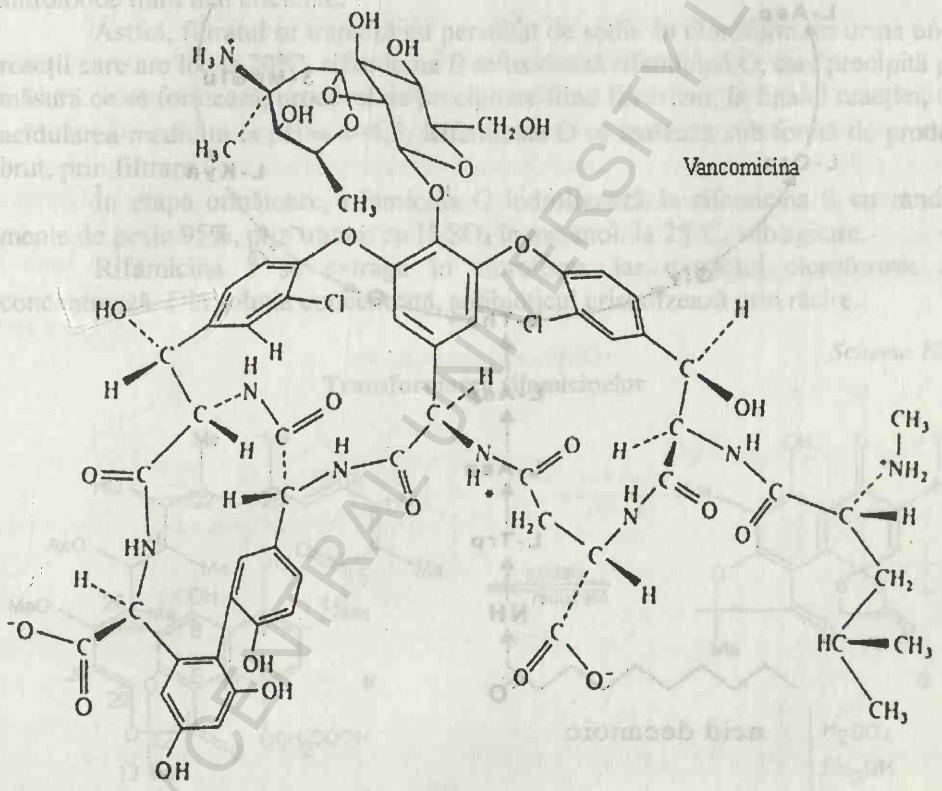
Colistina este de asemenea un antibiotic peptidic ciclic, izolat inițial din mediul de cultură al bacteriei *Bacillus colistinus* şi descris ca fiind un amestec de trei componente: colistină A, B, C. Ulterior s-a constatat că de fapt colistina este un amestec de două componente şi anume polimixina E_1 şi polimixina E_2, iar produsul denumit inițial colisitina A este identic cu polimixina E_1.



Polimixina	R
E_1 (Colistina A)	(+)-6-metiloctanoil
E_2	6-metilheptanoil

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Antibiotice glicopeptidice. Sunt molecule complexe alcătuite dintr-o heptapeptidă ciclică pe care sunt grefate diferite glucide, ca de exemplu, manoză şi glucozamină în cazul **teicoplaninei** sau glucoză şi vancozamină în cazul **vancomicinei** produsă de *Streptomyces orientalis (Nocardia orientalis)*. Un alt antibiotic cu structură glicopeptidică este **avoparcina**, care este utilizată în domeniul zoo-veterinar.



Vancomicina

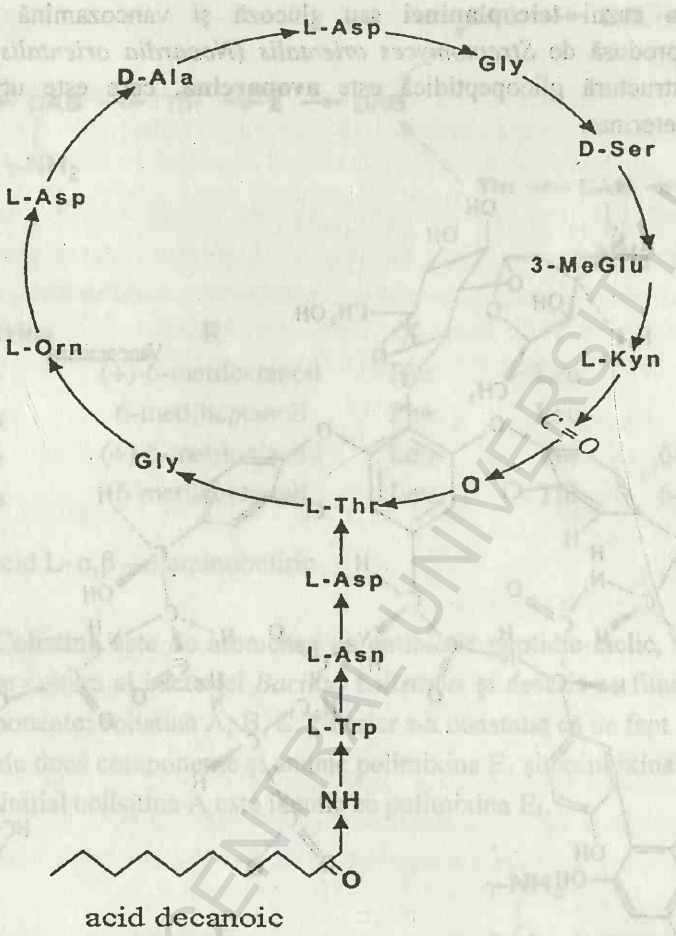
Aceste glicopeptide au efect bactericid, în special asupra bacteriilor Gram-pozitive (stafilococi, respectivi tulpini rezistente la meticilină), streptococi (respectiv enterococi, *Clostridium difficile*, etc). *In vitro*, aceste antibiotice acţionează sinergic cu aminoglicozidele.

Daptomicina este un antibiotic nou de tip lipopeptidic, produs de *Streptomyces roseosporus* şi izolat în laboratoarele Lilly, aflat în prezent în faza de testare clinică. Acest compus s-a dovedit activ faţă de numeroşi germeni Gram-pozitivi rezistenţi la alte antibiotice, ca de exemplu [Tally F.P., 2000]:

- enterococi rezistenţi la vancomicină;
- *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină;

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- *Staphylococcus aureus* relativ sensibil la glicopeptide;
- *Streptococcus pneumoniae* reziztent la penicilină.



10.7.3. Rifamicine

Rifamicinele alcătuiesc un grup de substanțe naturale şi de semisinteză, care au ca element structural comun un macrociclu lactamic în care este inclus un ciclu naftochinonic sau hidroxinaftalinic. Intensitatea acțiunii farmacologice a rifamicinelor poate fi modulată prin natura radicalilor grefați pe structura nafatalinică.

Rifamicinele naturale sunt produse de tulpini *Streptomyces mediterranei*, sub forma unui amestec de substanțe cu structură apropiată. Dintre acestea, prezintă importanță structura rifamicinei B, întrucât aceasta se găseşte în cantitatea cea mai mare şi poate suferi transformări chimice care au ca urmare creşterea intensității acțiunii farmacologice.

USAMV CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rifamicina B se obține la nivel industrial printr-o tehnologie de fermentație comună tuturor antibioticelor, în care se folosește un mediu de cultură ce conține ingredienții obișnuiți, la care se adaugă propilenglicol ca promotor și dietilbarbiturat.

În finalul fermentației, rifamicina B se găsește în spațiul extracelular. Întrucât nu prezintă activitate demnă de luat în seamă, rifamicina B nu se izolează din filtratul reținut după îndepărtarea miceliului, ci se prelucrează în continuare în soluție, pentru a fi transformată în intermediari din care se pot obține în final antibiotice mult mai eficiente.

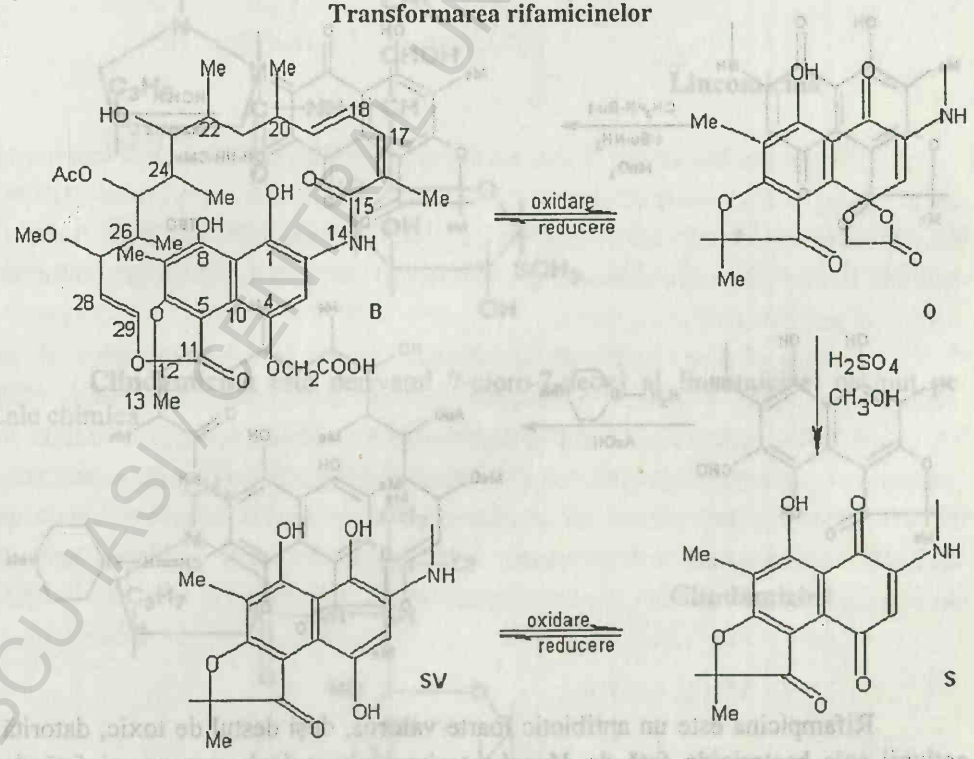
Astfel, filtratul se tratează cu persulfat de sodiu în cloroform. În urma unei reacții care are loc la 20°C, rifamicina B se oxidează rifamicină O, care precipită pe măsură ce se formează, procesul de precipitare fiind favorizat, în finalul reacției, de acidularea mediului la *p*H = 4–4,5. Rifamicina O se izolează sub formă de produs brut, prin filtrare.

În etapa următoare, rifamicina O hidrolizează la rifamicina S cu randamente de peste 95%, prin tratare cu H_2SO_4 în metanol, la 25°C, sub agitare.

Rifamicina S se extrage în cloroform, iar extractul cloroformic se concentrează. Din soluția concentrată, antibioticul cristalizează prin răcire.

Schema 10.8

Transformarea rifamicinelor



Rifamicina S obținută în urma acestui procedeu nu se folosește în scop terapeutic, ci constituie materia primă pentru obținerea unui antibiotic de semisinteză mult mai puternic, rifampicina, cunoscut și sub denumirea de Sinerdol.

Rifampicina este produsul de condensare al unei amino-piperazine cu 3-formil-rifamicina SV.

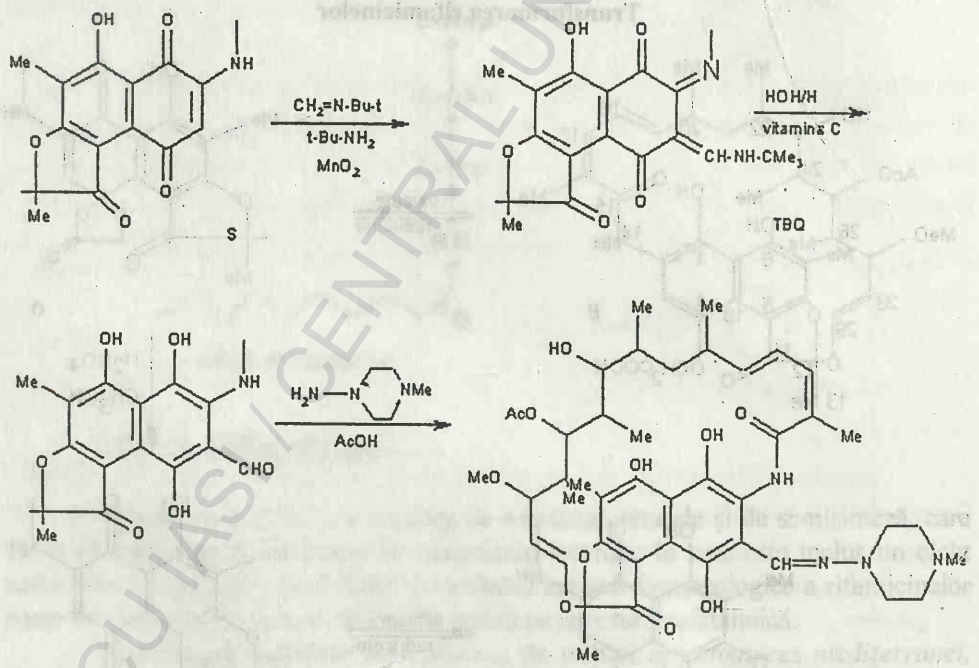
Pentru obținerea 3-formil-rifamicinei SV, se poate folosi reacția de condensare a rifamicinei S cu metilen-t-butilamina, în tetrahidrofuran, la 50°C. Transformarea are loc în prezența unui acceptor de hidrogen (MnO_2) și a t-butilaminei, care previne descompunerea metilen-derivatului. După 10–15 ore de regim, se obține intermediarul TBQ. Acesta hidrolizează în mediu acid (soluție de H_2SO_4 15%) la 0°C, în prezența unui agent reducător, rezultând 3-formil-rifamicina SV.

Introducerea grupei formil în poziția 3 se mai poate realiza prin reducerea rifamicinei S la rifamicină SV și tratarea acesteia cu formaldehidă. Această metodă prezintă însă riscul unor reacții secundare de condensare trimoleculară.

În final, rifampicina sau 3-(4-metil-piperazinil-imidometil)-rifamicina SV, se obține prin condensarea 3-formil-rifamicinei SV cu 1-metil-4-amino-piperazină. Reacția are loc cu randament de peste 65%, la 25...30 °C, în solvent organic și în prezența unui catalizator acid.

Schema 10.9

Obținerea rifampicinei



Rifampicina este un antibiotic foarte valoros, deși destul de toxic, datorită acțiunii sale bactericide față de *Mycobacterium tuberculosis*, precum și față de bacteriile Gram-pozitive și unele bacterii Gram-negative (*Neisseria gonorrhoeae*). Se folosește în tuberculoza pulmonară și extrapulmonară, în infecții stafilococice

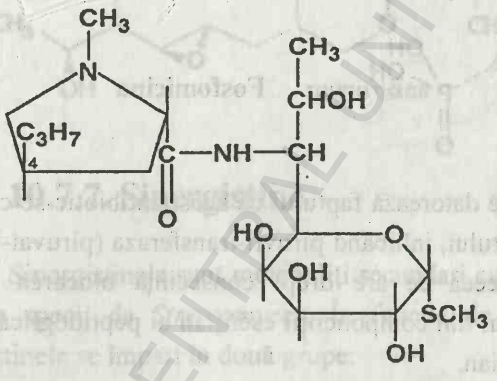
grave (endocardită, osteomielită, artrită septică), în septicemii cu germeni Gram-negativi sensibili, rezistenţi la alte antibiotice, în profilaxia meningitei meningococice şi în sterilizarea purtătorilor de meningococi, precum şi în tratamentul leprei, asociat cu alte chimioterapice.

Pentru toate indicaţiile terapeutice, este obligatorie asocierea cu alte antibiotice potrivite, cu scopul evitării dezvoltării rezistenţei.

10.7.4. Lincosamide

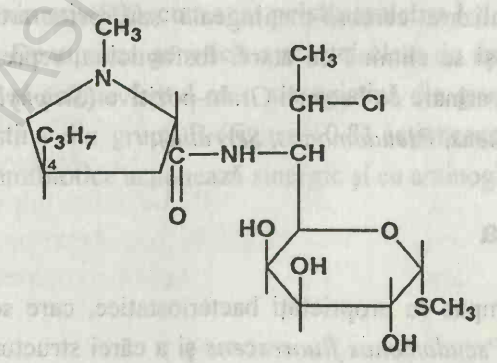
Lincosamidele, reprezentate la ora actuală de două molecule: lincomicina şi clindamicina, au ca element structural comun un acid carboxilic ce conţine un heterociclu azotat alchilat şi este ataşat printr-o legătură amidică de o 6-amino-tio-octopiranozidă.

Lincomicina a fost izolată pentru prima oară în 1962 din mediul de cultură al unui actinomicet, *Streptomyces lincolnensis,* provenit dintr-o probă de sol prelevată din zona Lincoln – Nebraska, SUA.



Lincomicină

Clindamicina este derivatul 7-cloro-7-deoxi al lincomicinei obţinut pe cale chimică.



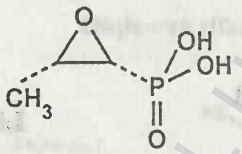
Clindamicină

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acţiunea antibacteriană a acestor antibiotice se bazează pe inhibarea sintezei proteice ca urmare a fixării lor pe subunitatea ribozomală 50 S şi, în consecinţă, a inhibării procesului de transpeptidare. Datorită situsului lor comun de fixare pe ribozomi, lincosamidele sunt antagonişti ai macrolidelor şi ai cloramfenicolului. Spectrul de acţiune a lincosamidelor cuprinde coci Gram-pozitici (cu excepţia *Streptococcus faecalis)* şi bacterii anaerobe (*Bacteroides fragilis, Clostridium*).

10.7.5. Fosfomicina

Fosfomicina este un antibiotic bactericid produs de diferite specii bacteriene aparţinând genului *Streptomyces* şi de *Pseudomonas syringae.* Din punct de vedere al structurii chimice, fosfomicina se încadrează în familia acizilor fosfonici.



Fosfomicina

Efectul său bactericid se datorează faptului că acest antibiotic se comportă ca un analog al fosfoenolpiruvatului, inhibând piruvil-transferaza (piruvat-UDP-N-acetilglucozamin-transferaza), ceea ce are drept consecinţă blocarea formării acidului N-acetilmuraminic, unul din componenţii esenţiali ai peptidoglicanului ce formează peretele celular bacterian.

Deoarece acest antibiotic se absoarbe greu la nivel digestiv, el se administrază în special pe cale parenterală. Datorită masei moleculare reduse (138 Da), fosfomicina prezintă o bună difuzie tisulară (ceea ce o face utilizabilă în tratamentul infecţiilor cu localizare cerebro-meningeală sau osteo-articulară). Deoarece nu se metabolizează şi se elimină ca atare, fosfomicina, reprezintă un antibiotic de ales pentru infecţii urinare cu bacterii Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus)* sau Gram-negative (*Proteus, Pseudomonas, Serratia*).

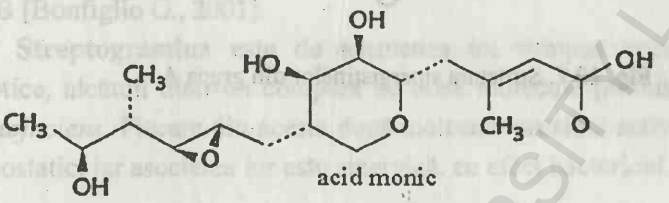
10.7.6. Mupirocina

Mupirocina este un compus cu proprietăţi bacteriostatice, care se obţine prin cultivarea unor tulpini de *Pseudomonas fluorescens* şi a cărei structură nu se

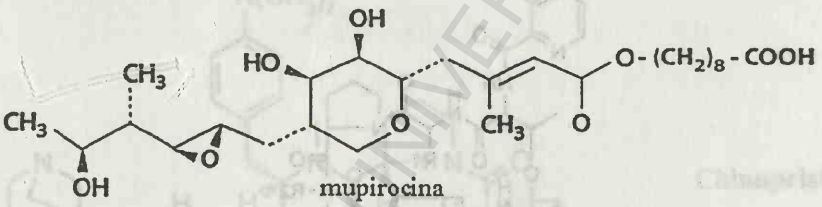
încadrează în nici una din clasele cunoscute de antibiotice. Molecula mupirocinei este formată din acid monic de care este legat un acid gras cu catenă scurtă.

Acțiunea antibacteriană a mupirocinei se bazează pe proprietatea ei de a inhiba competitiv enzima izoleucil-tARN-sintetaza.

Mupirocina este utilizată topic la nivel cutanat și al mucoaselor.



acid monic



mupirocina

10.7.7. Sinergistine

Sinergistinele sunt metaboliți secundari cu activitate antibiotică produși de anumite specii de *Streptomyces*. În funcție de particularitățile lor structurale, sinergistinele se împart în două grupe:

– grupa A (sau M) cuprinde lactone macrociclice cu masă moleculară de aproximativ 500 (cum sunt **pristinamicina II** și **virginiamicina M**)

– grupa B (sau S) cuprinde hexadepsipeptide ciclice, cu masă moleculară de aproximativ 800 (cum sunt **pristinamicina I** și **virginiamicina S**).

Denumirea generică a acestei clase de antibiotice sugerează modul lor de acțiune și anume faptul că o sinergistină din grupa A (figura 10.7) asociată cu o sinergistină din grupa B (figura 10.8) acționează în mod sinergic. De asemenea aceste antibiotice acționează sinergic și cu aminoglicozide și rifampicina.

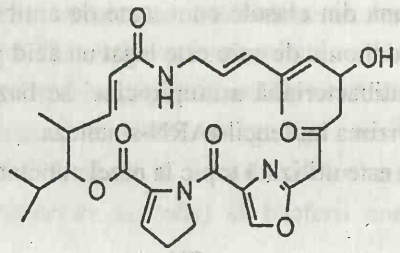
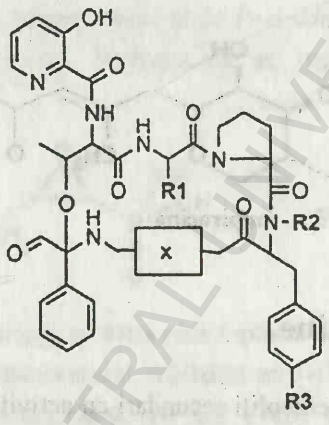


Fig. 10.7. Structura sinergistinelor din grupa A.



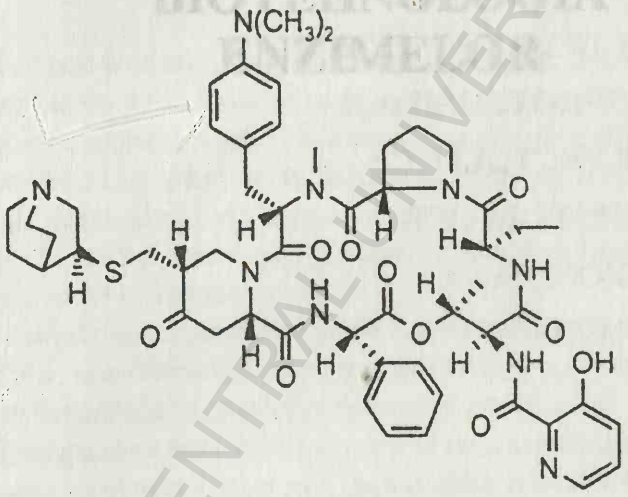
	R1	R2	R3	X
Streptogramina B	$-CH_2CH_3$	$-CH_3$	$-N(CH_3)_2$	acid 4-oxopipecolic
Vernamicina B beta	$-CH_2CH_3$	$-CH_3$	$-NHCH_3$	acid 4-oxopipecolic
Vernamicina B gama	$-CH_3$	$-CH_3$	$-N(CH_3)_2$	acid 4-oxopipecolic
Vernamicina B delta	$-CH_3$	$-CH_3$	$-NHCH_3$	acid 4-oxopipecolic
Vernamicina C	$-CH_2CH_3$	$-CH_3$	$-N(CH_3)_2$	acid L-aspartic
Ostreogricina B 3	$-CH_2CH_3$	$-CH_3$	$-N(CH_3)_2$	acid 3-hidroxi-4-oxopipecolic
Patricina A	$-CH_2CH_3$	$-CH_3$	-H	prolina
Patricina B	$-CH_2CH_3$	$-CH_3$	-H	acid pipecolic
Virginiamicina S1	$-CH_2CH_3$	$-CH_3$	-H	acid 4-oxopipecolic
Virginiamicina S2	$-CH_2CH_3$	-H	-H	acid 4-hidroxipipecolic
Virginiamicina S3	$-CH_2CH_3$	$-CH_3$	-H	acid 3-hidroxi-4-oxopipecolic
Virginiamicina S4	$-CH_3$	$-CH_3$	-H	acid 4-oxopipecolic

Fig. 10.8. Sinergistine din grupa B.

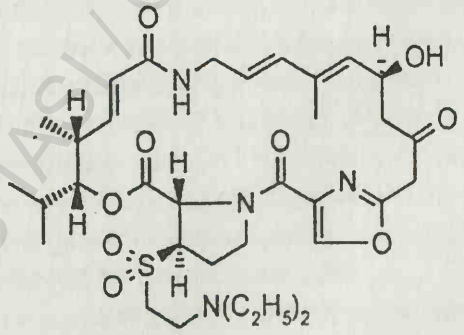
UAIC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pristinamicinele şi virginiamicinele naturale sunt compuşi alcătuiţi dintr-un amestec de metaboliţi secundari produşi de *Streptomyces pristinaespiralis* şi respectiv de *Streptomyces virginiae*. Aceşti compuşi sunt foarte greu solubili în apă, ceea ce limitează drastic utilizarea lor terapeutică. Modificarea chimică a acestor compuşi a permis obţinerea unor molecule solubile în apă, ca de exemplu **chinupristina** (sau **RP 57669**) din grupa A şi **dalfopristina** (sau **P 54476**) din grupa B [Bonfiglio G., 2001].

Streptogramina este de asemenea un compus natural cu proprietăţi antibiotice, alcătuit dintr-un complex de două molecule produse de *Streptomyces graminofaciens*. Fiecare din aceste două molecule prezintă activitate proprie de tip bacteriostatic, iar asocierea lor este sinergică, cu efect bactericid.



Chinupristina



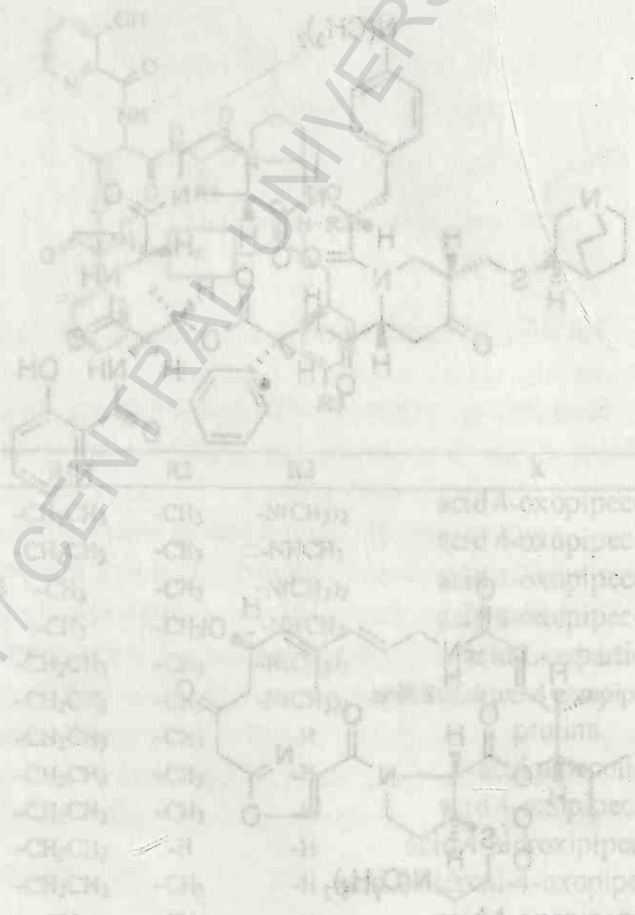
Dalfopristina

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sinergistinele acționează asupra subunității 50 S a ribozomului bacterian, interferând cu metabolismul ARN-ului prin două mecanisme distincte: împiedicarea încorporării moleculelor de ARN_t la nivelul ribozomilor și împiedicarea traducerii ARN_m.

Compușii I ş II prezintă un sinergism remarcabil: prin asocierea lor se obține o activitate antibiotică de câteva ori mai mare decât cea a componentelor separate.

Sinergistinele sunt antibiotice bactericide.



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Partea a III-a

BIOTEHNOLOGIA ENZIMELOR

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- ENZIME DE FERMENTAȚIE – GENERALITĂȚI
- METODE DE BIOSINTEZĂ A ENZIMELOR
- ENZIME AMILOLITICE
- ENZIME CELULOZOLITICE
- ENZIME PROTEOLITICE
- ENZIME PECTOLITICE
- ENZIME LIPOLITICE
- GLUCOZOXIDAZA
- INVERTAZA

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

11. ENZIME DE FERMENTAȚIE – GENERALITĂȚI

11.1. SCURT ISTORIC

Enzimele sunt utilizate în practică de mii de ani, înainte ca natura şi rolul lor în reacţii să fie înţelese. Un exemplu în acest sens este obţinerea brânzeturilor cu ajutorul stomacului de viţel. Utilizarea acestui procedeu este atât de veche încât data descoperirii sale a fost uitată. În Orient, preparatele enzimatice brute (koji) obţinute din fungi ce se formau pe suprafaţa orezului alimentar erau folosite de multe sute de ani în conservarea, condimentarea şi modificarea de consistenţă a diferitelor produse alimentare.

Enzimele au fost denumite prima dată cu termenul de „fermenţi", în 1897, când Buchner, prin distrugerea pereţilor celulelor de drojdie obţine un mojarat care catalizează fermentaţia alcoolică şi a demonstrat pentru prima dată că enzimele pot funcţiona independent de celule. În prezent se cunosc aproximativ 3200 de enzime diferite care s-au obţinut în stare pură (prin cristalizare), sau sub formă de preparate cu diferite grade de puritate aproximativ 1000–1500.

Enzimele sunt prezente în toate organismele vii şi se găsesc în toate tipurile de celule animale, în fluidele corporale (sânge, limfă, lichid cefalorahidian, lichid intestinal), în unele secreţii specifice pentru diferite organe (stomac, pancreas, intestin subţire, rinichi etc.), la plante şi în toate virusurile şi microorganismele care populează diferite zone ale Pământului. Numărul şi abundenţa lor depind însă de poziţia pe scara filogenetică a organismului. La plantele şi la animalele superioare, enzimele se găsesc în toate celulele vii ale acestora, însă distribuţia lor variază după natura ţesutului din care fac parte celulele.

La microorganisme, echipamentul enzimatic şi concentraţia diferitelor enzime depind de specia microorganismului şi sunt influenţate, în mare măsură, de condiţiile mediului exterior. În procesul de obţinere a preparatelor enzimatice se folosesc sursele care sunt foarte bogate în enzimele dorite, sunt ieftine, accesibile şi

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

se prelucrează uşor. Materiile prime folosite la fabricarea preparatelor enzimatice pot fi de natură vegetală, animală sau microbiană. La plante, concentraţii mari de enzime se pot întâlni în seminţe, în boabe germinate, în fructe, frunze, rădăcini. La animale, enzimele se găsesc însă în cantităţi mari în diferite organe (rinichi, ficat, pancreas, mucoasa stomacului).

O sursă foarte importantă de enzime utilizată frecvent pentru fabricarea preparatelor enzimatice o formează microorganismele. Ele au mai multe avantaje faţă de sursele de enzime atât de origine vegetală cât şi animală. Microorganismele se pot obţine cu uşurinţă, în cantităţi mari, prin înmulţire în instalaţii speciale, pe medii de cultură ieftine. În acest fel, obţinerea unor cantităţi mari de preparate enzimatice nu este limitată de lipsa sau de costurile materiei prime, ca în cazul enzimelor de origine animală. Ciclul de dezvoltare al microorganismelor este foarte scurt în raport cu ciclul de dezvoltare al animalelor şi plantelor, iar mediile de cultură pe care se cultivă microorganismele sunt, de regulă, subproduse agricole sau/şi ale industriei alimentare.

Prima exploatare modernă a enzimelor de fermentaţie o datorăm lui Takamine, care, în 1894, a extras cu succes un amestec enzimatic din orez fermentat numit „koji" bogat în α-amilază şi care s-a vândut în Japonia ca un adaos digestiv de uz uman. Mai târziu, s-a iniţiat în Statele Unite producţia de „takadiastază".

La începutul secolului al XII-lea, Otto Rohm, în Germania, a descoperit că efectul de curăţare a pielii cu ajutorul excrementelor de câine şi de porc se datorează enzimelor proteolitice pe care acestea le conţin. El a demonstrat ulterior că enzimele extrase din pancreasul animal sunt mai bune decât excrementele şi a arătat că acestea se pot obţine şi prin cultivarea fungilor în culturi de suprafaţă. Enzimele extrase din organismele superioare şi-au găsit foarte devreme numeroase aplicaţii. De exemplu, studiile asupra fenomenului de terciuire la fabricarea berii a relevat importanţa enzimelor din malţ asupra mobilităţii glucidelor şi proteinelor de rezervă. Aceasta a condus la utilizarea extractului de malţ îmbogăţit în enzime şi în alte domenii. Efectul de frăgezire a cărnii cu ajutorul plantei tropicale *Carica papaya* se datorează înaltei activităţi proteolitice a sucului acesteia, astfel încât acum această plantă se cultivă special în acest scop. Alte enzime se extrag din diferite organe ale animalelor. Un exemplu de acest fel îl constituie tripsina şi chimotripsina, care se extrag din pancreas de porc. Alcooldehidrogenaza se extrage din ficatul de cal, iar catalaza din ficatul de bovine. Sursele de enzime aşa cum sunt cele din organele de la animalele domestice par a fi mai economice faţă de procedeul cultivării de microorganisme şi în momentul de faţă o parte din cererea pieţei pentru enzime este satisfăcută de aceste preparate enzimatice extrase din

plante și organisme animale superioare. Ele prezintă, însă, uneori câteva dezavantaje. Țesuturile animale necesare extracției enzimelor sunt limitate. Prin urmare, în cazul unei cereri temporare mari de enzime este dificil să se coreleze cererea cu oferta. De aceea este nevoie de metode intensive de cultivare și colectare a materiei prime necesare obținerii enzimelor. Adesea este o competiție pentru materialele din care se extrag produse biologice valoroase. Din cauză că aprovizionarea cu materii prime provenite din agricultură este în mod obișnuit sezonieră și uneori necontrolabilă, datorită condițiilor climatice adesea nefavorabile, enzimele extrase din aceste surse sunt considerate mai mult un subprodus al materiilor prime agricole decât un produs primar.

Din acest punct de vedere, altfel stau lucrurile cu microorganismele utilizate ca sursă de enzime.

Până în anul 1945, obținerea enzimelor prin fermentație la nivel industrial s-a putut dezvolta și extinde încet datorită faptului că sistemul de cultivare de suprafață a microorganismelor avea posibilități limitate. Începând însă cu anul 1940, a fost pusă la punct *tehnica fermentației în sistem submers*, în vase agitate și aerate, care s-a dezvoltat mai întâi pentru antibiotice și s-a dovedit o metodă excelentă de cultivare a microorganismelor. Foarte repede aceasta a fost aplicată pentru fabricarea enzimelor utilizând bacterii. Fabricarea enzimelor în sistem submers, după anul 1940, s-a extins foarte mult, iar vânzările au crescut în timp, în mod considerabil, astfel încât la ora actuală se produc 2–3 t enzime proteolitice anual. Cronologia introducerii în fabricație a enzimelor de fermentație poate fi urmărită în tabelul 11.1.

Recent au apărut numeroase studii referitoare la biosinteza enzimelor, cu specificarea microorganismelor producătoare [Aunstrup, 1980]. Lambert descrie detaliat tehnica de obținere a enzimelor din fungi, acordând spații largi proceselor de *fermentație pe mediu solid* [Lambert, 1983].

Tabelul 11.1

Date aproximative privind începuturile producerii diferitelor enzime prin fermentație (după G. M. Frost, 1984)

Perioada	Enzima produsă	Tipul de fermentație	Specia producătoare
1	2	3	4
Înainte de 1920	α-Amilază	Substrat solid	*Aspergillus oryzae*
1920–1930	Pectinază	Substrat solid	*Aspergillus niger*
	α-Amilază	Lichid de cultură neagitat	*Bacillus subtilis*

Tabelul 11.1 (continuare)

1	2	3	4
1930–1940	Proteinaze	Substrat solid	*Aspergillus niger*
1940–1950	Amiloglucozidază	Substrat solid	*Aspergillus niger*
1950–1960	α-Amilază	Submers	*Bacillus subtilis*
	Glucozoxidază/catalază	Submers	*Aspergillus niger*
	Amiloglucozidază	submers	*Aspergillus niger*
1960-1970	Proteinaze (pentru coagularea laptelui)	Substrat solid	*Mucor spp.*
	Proteinaze	Submers	*Bacillus spp.*
	β-Galactozidază (lactază)	Substrat solid	*Kluyveromyces spp.*
	β-Galactozidază (lactază)	Substrat solid	*Aspergillus spp.*
1970-	α-Amilază termorezistentă	Submers	*Bacillus licheniformis*
	Glucozizomerază	Submers	Diferite surse microbiene
	Pullulanază	Submers	*Klebsiella aerogenes*

11.2. AVANTAJELE PRODUCERII ENZIMELOR PRIN FERMENTAȚIE

Este recunoscut faptul că celulele microbiene au un potențial deosebit ca sursă de enzime, oferind o serie de avantaje:

– cultivarea de celule microbiene poate fi mărită relativ ușor, dacă cererea pieței este mare, prin ridicarea la scară pilot sau industrială a procedeului;

– celulele microbiene au o varietate mai mare de enzime care pot fi extrase și cu un spectru de utilizare mult mai larg;

– în contrast cu organismele superioare, celulele microbiene pot fi cultivate repede și ușor în condiții controlate pe medii de cultură accesibile și relativ ieftine. Ele pot fi modificate genetic cu ușurință, sporind considerabil eficiența lor de sinteză. Datorită unui interval de generație scurt (mai puțin de 30 de minute în unele cazuri), ele pot fi rapid îmbunătățite prin tehnici speciale, moderne;

– ciclul unei fermentații discontinue este de 1–10 zile, în timp ce ciclul de viață tipic pentru un organism superior este cuprins între 1 lună și câțiva ani,

ceea ce nu permite investigații și îmbunătățiri de productivitate într-un timp rezonabil. Fermentația permite utilizarea unei tulpini selecționate care să asigure o productivitate înaltă și permanentă.

Flexibilitatea proceselor de fermentație poate fi ilustrată de producția de enzime de coagulare a laptelui utilizate în industria de brânzeturi. Inițial, în acest scop s-a utilizat stomac integral de vițel. Mai târziu s-a dezvoltat procedeul utilizării extractelor enzimatice din stomac de vițel, acestea conținând proteinaze și renină. Deoarece, după anul 1950, numărul de viței sacrificați a scăzut în raport cu producția de brânzeturi care a crescut, a fost necesar să se găsească o altă modalitate de obținere a enzimelor coagulante ale laptelui. Așa s-a ajuns la ideea folosirii microorganismelor pentru obținerea preparatelor enzimatice. În 1968, Sardinas a descris un program în care s-au testat 921 de tulpini bacteriene și o specie de ciuperci: (*Endothia parasitica*) producătoare de enzime potrivite pentru coagularea laptelui. Cel mai mare succes l-a înregistrat enzima produsă din *Mucor miehei*, care se vinde la concurență cu renina de vițel sau cu amestecul conținând pepsină de porc și de vițel care sunt coagulanții efectivi ai laptelui.

O instalație industrială de producere a enzimelor prin biosinteză microbiană poate fi proiectată la o scară foarte apropiată de cerința pieței. Dacă mai târziu necesarul de enzime scade din diverse motive, instalația respectivă poate fi adaptată pentru alte produse de fermentație. Acest lucru s-a întâmplat în producția mondială de proteinaze utilizate în industria de detergenți. La începutul anului 1970, dintr-o dată a scăzut cererea de proteaze pentru detergenți, a apărut un exces de capacitate de producție, dar acesta s-a utilizat la producerea amiloglucozidazei solicitată în cantități mari de industria amidonului, în plină dezvoltare la acea vreme.

După ce enzimele extrase din organismele superioare au fost utilizate și s-a dovedit avantajul lor, se pot aplica două tehnici care oferă posibilitatea transferării producției lor într-un bioproces. Astfel, în perioada 1980–1990, s-au stabilit la nivel de laborator tehnologii de culturi de celule animale sau vegetale care ulterior au fost folosite la extracția enzimelor. În prezent pentru culturi de celule vegetale s-au pus la punct procedee de obținere la nivel industrial, dar, în cazul celulelor animale, acestea sunt mult mai fragile și nu supraviețuiesc în asemenea instalații. O alternativă posibilă și mult studiată în prezent în domeniul producerii enzimelor o constituie transferul genelor de interes în celule de microorganisme împreună cu promotori potriviți, care să permită un nivel înalt de expresie. Această tehnică s-a aplicat la renina de vițel, la care precursori ai enzimei s-au exprimat prin gene clonate în tulpini de *Escherichia coli* și *Sacharomyces cerevisiae.* Precursorii au fost purificați, activați și s-a demonstrat că ei posedă aceleași proprietăți ca enzima purificată din stomac de vițel.

11.3. ENZIME MICROBIENE CU APLICAȚII INDUSTRIALE. DOMENII DE UTILIZARE

Principalele aplicații ale enzimelor de fermentație utilizate pe scară largă în perioada de după 1983 sunt prezentate în tabelul 11.2 [Frost şi Moss, 1984, 1985].

Tabelul 11.2

Enzime microbiene cu aplicații industriale

Denumirea enzimei	Industriile utilizatoare	Tipul de fermentație	Felul enzimei	Forma de condiționare
1	2	3	4	5
1. Enzime proteolitice				
Enzime proteolitice bacteriene alcaline	Detergenți Procese alimentare Pielărie	Submers	Extracelulare (Ex)	Lichid (L) Solid (S)
Enzime proteolitice bacteriene neutre	Industria berii Industria alimentară	Submers	Extracelulare (Ex)	
Enzime proteolitice fungice	Panificație Industria brânzeturilor	Submers Submers în culturi de suprafață	Extracelulare (Ex)	Solid (S) Lichid (L) Solid (S)
2. Enzime amilolitice				
α -Amilaze bacteriene	Amidon, bere Detergenți, textile	Submers	Extracelulare (Ex)	Lichid (L) Solid (S)
α -Amilaze fungice	Amidon, Panificație	Submers	Extracelulare (Ex)	Lichid (L) Solid (S)
Amiloglucozidaze	Amidon, bere	Submers	Extracelulare (Ex)	Lichid (L) Solid (S)
Pullulanaze	Amidon	Submers în culturi de suprafață	Extracelulare (Ex) Intracelulare (In)	Lichid (L) Solid (S)
3. Alte glicozidaze				
Lactază (β-galactozidază)	Industria laptelui	Submers în culturi de suprafață	Extracelulare (Ex) Intracelulare (In)	Lichid (L) Solid (S)
Invertază	Industria textilă	Submers	Intracelulare (In)	Lichid (L) Solid (S)
Rafinază (α-galactozidază)	Rafinarea zahărului	Submers	Intracelulare (In)	Imobilizată (Im)
Celulaze	Industria alimentară (sucuri)	Submers	Extracelulare (Ex)	Lichid (L) Solid (S)
β-1,3(4)-Glucanaze	Fabricarea berii	Submers	Extracelulare (Ex)	Lichid (L)

Tabelul 11.2 (continuare)

1	2	3	4	5
4. Alte hidrolaze				
Lipaze	Industria alimentară Teste de diagnostic	Submers	Extracelulare (Ex)	Solid (S)
Pectinaze	Industria de sucuri și băuturi alcoolice	Submers în culturi de suprafață	Extracelulare (Ex)	Lichid (L) Solid (S)
5. Alte enzime				
Glucozizomerază	Amidon	Submers	Intracelulare (In)	Im
Glucozoxidază	Industria alimentară (sucuri, băuturi tari) Teste de diagnostic	Submers	Intracelulare (In)	Solid (S) Lichid (L)
Catalază	Industria alimentară (sucuri)	Submers	Intracelulare (In)	Lichid (L) Solid (S)
Penicilinacilază	Antibiotice	Submers	Intracelulare (In)	Im

O analiză a pieței de enzime a fost efectuată și de Godfrey și Reichelt, în 1983. Enzimele de fermentație reprezintă aproximativ 80% din totalul de enzime produse astăzi în lume. Dintre celelalte enzime, obținute prin extracție, necesitățile sunt acoperite de următoarele preparate: cheag de vițel, β-amilaza din orz, proteinaza pancreatică și mici cantități de enzime cu uz farmaceutic sau analitic.

Dintre enzimele de fermentație, cea mai mare piață de desfacere o au proteinazele bacteriene alkaline utilizate în detergenți. Proteinazele microbiene acoperă 40% din totalul pieței, iar glicozidazele aproximativ 20%, astfel că enzimele hidrolitice domină piața. Cantitatea de enzime estimată a fi vândută anual este de 65 000 t. Conținutul în proteină al enzimelor comercializate variază între 1% în produsele nepurificate, sub formă lichidă, și 100% în produsele precipitate și uscate. Valoarea totală a vânzărilor se situează anual la nivelul de 600 milioane de dolari.

11.2. ENZIME INTRACELULARE DE FERMENTAȚIE

În categoria enzimelor intracelulare sunt incluse toate enzimele care rămân cu biomasa, după separarea lichidului de fermentație. Unele enzime se acumulează probabil în periplasmă, astfel încât în mediul de cultură se află cantități mici de enzime rezultate din ruperea pereților unui număr mic de celule.

BCU IAȘI UNIVERSITY LIBRARY

În tabelul 11.3 sunt enumerate cele mai importante enzime microbiene intracelulare cu aplicații industriale. Majoritatea acestor enzime acționează asupra unor substraturi cu masă moleculară mică. Aceasta se explică prin faptul că numai substraturile mici pot pătrunde în celule și funcționează astfel ca inductori ai enzimelor care le degradează. Spre deosebire de acestea, enzimele extracelulare acționează, în general, asupra substraturilor cu masă moleculară mare.

Enzimele intracelulare se împart în două categorii: unele au o poziție centrală în metabolismul organismului în creștere și se produc în cantități mari în biomasă, altele au un rol secundar, obscur și se produc în cantități mici. Pentru utilizarea acestora din urmă în scopuri industriale, este necesară imobilizarea lor, astfel încât să fie economică și justificată folosirea lor.

Tabelul 11.3

Enzime intracelulare, de fermentație, cu aplicații industriale

Enzima	Microorganismul producător	Durata fermentației, [h]	Nivelul de producție	După
Penicillin-acilază	*Escherichia coli* *Escherichia coli*	48 10	Laborator 100 l	Dogariu și colab., 1975 Self, 1969
α-Galactozidază	*Mortierella vinacea* *Saccharomyces cerevisiae*	72 48	Laborator Laborator	Suzuki, 1969 Olivieri, 1984
Glucozizomerază	*Streptomyces albus* *Streptomyces sp.*	53 72	Laborator Laborator	Agenția industrială de Știință și Tehnologie, 1974 Stoichev, 1981
Glucozoxidază	*Aspergillus niger*	20	500 l	Zetelaki, 1970
Pullulanază	*Klebsiella aerogenes*	23	15 l	Bulich, 1978
Lactază	*Candida pseudotropicalis*	24	Laborator	De Bales și Castillo, 1979

În ceea ce privește activitatea enzimatică a preparatelor de acest fel, aceasta reprezintă, de cele mai multe ori, un secret de serviciu, deoarece poate face oricând obiectul unui brevet de invenție. Pentru ca o enzimă să fie economică, ea trebuie să aibă o activitate enzimatică minimă (de aproximativ 100 UE/ml). De aceea, unele enzime cum sunt, de exemplu, penicilinacilaza, glucozizomeraza, α-galactozidaza la care nu se atinge această valoare se imobilizează. Alteori, aceste

enzime se utilizează pentru atacul unor impurităţi care incomodează procesul, dar nu se doreşte atacul componentei majoritare; de exemplu, pullulanaza este folosită la hidroliza legăturilor α-1,6 aflate în număr mic în amidon pentru a facilita acţiunea amiloglucozidazei sau β-amilazei. Glucozoxidaza este folosită, de exemplu, pentru îndepărtarea urmelor de glucoză din praful de ouă folosit la obţinerea maionezei şi în acest caz nu trebuie să aibă o activitate enzimatică mare. În alte cazuri, glucozoxidaza, care este o enzimă implicată în mecanismul de reglare a *p*H-ului, se acumulează în cantităţi mari în miceliul de *Aspergillus niger*. Lactaza se produce în medii de fermentaţie pe bază de lactoză şi în acest caz se produc cantităţi mari din această enzimă.

Producerea enzimelor intracelulare prin fermentaţie ridică unele probleme specifice. Bioprocesul trebuie astfel condus încât pe parcursul biosintezei să se evite spargerea celulelor. Dacă se alege un mediu de fermentaţie în care activitatea enzimatică este distribuită atât în celule cât şi în lichidul de fermentaţie, izolarea şi purificarea enzimei este dificilă.

Un alt aspect se referă la stabilitatea enzimelor; unele enzime sunt stabile în mediul intracelular şi devin instabile în afara celulei.

Unul dintre dezavantajele procedeelor de obţinere prin biosinteză a enzimelor intracelulare îl constituie necesitatea eliberării acestora din celule, prin distrugerea membranei celulare, extracţie şi ulterior separarea extractului de resturile celulare. În plus, enzimele sunt impurificate cu toate proteinele intracelulare, chiar dacă enzima dorită se află în proporţie mare în totalul proteinelor extrase din celule. Un avantaj tehnologic al enzimelor intracelulare îl constituie faptul că extracţia se poate efectua cu un volum mic de soluţie tampon, ceea ce conduce la obţinerea unui extract brut cu conţinut mare în enzimă şi nu mai este necesară concentrarea ulterioară a acesteia. În ansamblu, însă, recuperarea enzimelor extracelulare este un proces mai avantajos şi mai ieftin decât a celor intracelulare.

11.5. ENZIME DE FERMENTAŢIE, EXTRACELULARE

Aunstrup a făcut o recenzie completă a enzimelor de fermentaţie extracelulare, cu aplicaţii industriale [Aunstrup, 1980].

Cele mai importante enzime microbiene extracelulare sunt, în general, hidrolazele (proteinaze, amilaze, celulaze) care acţionează asupra substraturilor cu masă moleculară mare. Pentru microorganisme, este normal, din punct de vedere fiziologic, să producă nutrienţi din polimerii biologici disponibili în mediul

înconjurător celulelor. Pentru a ataca mai uşor substraturile, microorganismele îşi produc singure enzimele necesare hidrolizei acestora şi uneori această producţie de enzime este optimă chiar la tulpinile sălbatice.

Enzimele hidrolitice produse prin fermentaţie şi utilizate în cantităţi mari în industrie sunt proteazele, amilazele şi celulazele. Acestea sunt comercializate şi utilizate în industria: detergenţilor, alimentară şi textilă.

Majoritatea enzimelor extracelulare comerciale sunt utilizate la temperaturi de până la 100°C, chiar dacă acestea, în general, sunt instabile în timp. Ele au, de asemenea, o toleranţă limitată la *p*H. La temperatura camerei sunt, în general, instabile dacă nu sunt condiţionate în mod specific. Păstrarea la 4°C conferă enzimelor o stabilitate în timp mult mai mare.

Pentru că producţia unei enzime extracelulare utilizează în cea mai mare parte resursele disponibile ale celulei, biosinteza şi secreţia unei astfel de enzime sunt supuse unui complex de factori reglatori. În general, producţia acestor enzime este indusă de niveluri reduse ale produşilor de reacţie ai polimerilor, iar uneori polimerii înşişi funcţionează ca inductori. Alteori, compuşii care nu sunt substraturi pentru enzime, dar sunt înrudiţi ca structură cu acestea, pot funcţiona ca inductori. De exemplu, producţia de celulaze este indusă atât de lactoză, cât şi de celobioză. Producţia acestor enzime este, de asemenea, supusă represiei prin cataboliţi. Atâta timp cât nutrienţii cu masă moleculară mică sunt disponibili, celulele cresc fără să producă hidrolaze şi abia la epuizarea nutrienţilor începe biosinteza enzimelor hidrolitice extracelulare. Astfel, inducţia şi represia biosintezei enzimelor sunt fenomene complexe ce au loc în concordanţă cu condiţiile de mediu în care se găsesc celulele.

Enzimele extracelulare reprezintă 80% din producţia de enzime de fermentaţie comercializate la ora actuală. Cele cu utilizări în industrie se produc în bioreactoare de 10–250 m^3, în instalaţii speciale, fiind considerate produse de mare tonaj. Aceste enzime prezintă avantajul unei prelucrări mai rapide, nefiind necesară extracţia din celule (operaţie ce ridică probleme la nivel industrial).

11.6. ENZIME MICROBIENE DE UZ BIOCHIMIC

Spre deosebire de enzimele descrise anterior, există un set de enzime microbiene care se produc în cantităţi mici şi se aduc într-o formă cu grad avansat de purificare. Acestea se folosesc, în general, în determinări analitice sau în medicină. Un exemplu în acest sens îl constituie glucozoxidaza şi lipaza utilizate în testele enzimatice de dozare a glucozei în sânge şi, respectiv, la hidroliza trigliceridelor din sânge.

Enzimele pentru testele de diagnostic se produc în bioreactoare de până la 10 m^3; cererea lor pe piață este mult mai mică, iar uneori necesarul este acoperit prin extracția acestora din celule vegetale sau animale. În anul 1985, numai 50 % din totalul enzimelor de diagnostic erau produse prin procedee fermentative. Pentru că necesarul de astfel de enzime este mic și puritatea cerută este foarte mare, prețul acestor enzime per unitate enzimatică este mult mai mare decât al enzimelor industriale care sunt foarte ieftine (fiind considerate produse de mare tonaj). Pentru enzimele de mic tonaj s-au pus la punct procedee de producție și purificare cuprinzând volume de 50–2000 l mediu de cultură (pentru enzimele extracelulare) sau 1–50 kg biomasă (pentru enzimele intracelulare). Procedeele la acest nivel sunt considerate „scară industrială" [Scawen ș.a.,1980]. Unele enzime sunt produse și purificate numai în scop de cercetare. În acest caz, metodele de purificare sunt mai bine puse la punct decât procesele de obținere propriu-zisă a enzimelor.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

12. METODE DE BIOSINTEZĂ A ENZIMELOR

12.1. MICROORGANISME PRODUCĂTOARE DE ENZIME

Prima problemă care se pune la obţinerea de preparate enzimatice cu ajutorul microorganismelor este găsirea unui microorganism care să producă în cantitate mare enzima sau sistemul enzimatic dorit. Pentru fabricarea preparatelor enzimatice, un interes practic deosebit îl prezintă microorganismele heterotrofe.

Pentru ca un microorganism să poată ataca un substrat natural şi să-l metabolizeze, el trebuie să posede enzimele necesare care să catalizeze reacţiile de metabolism, în condiţiile de mediu proprii pentru dezvoltare. Totalitatea enzimelor pe care un microorganism le posedă în permanenţă sau pe care poate să le elaboreze la nevoie formează echipamentul enzimatic potenţial al microorganismului. Însuşi echipamentul enzimatic este, la rândul lui, determinat de genetica microorganismului. Zestrea ereditară constituită din gene care sintetizează enzimele microorganismelor variază însă de la o specie la alta.

Majoritatea enzimelor care alcătuiesc echipamentele enzimatice ale microorganismelor sunt enzime intracelulare. Aceasta înseamnă că enzimele sintetizate de gene, după formare, rămân în celulă, nefiind secretate în mediul înconjurător, în care microorganismele se dezvoltă. Activitatea lor se desfăşoară în interiorul celulei. Unele microorganisme, cum sunt drojdiile, bacteriile lactice, nu conţin decât enzime intracelulare. La astfel de microorganisme eliberarea enzimelor în mediul înconjurător are loc abia după moartea celulelor, în urma proceselor de autoliză. Din această cauză, astfel de microorganisme nu metabolizează decât substraturi nutritive solubile şi permeabile prin membranele lor celulare.

Alte microorganisme, aşa cum sunt bacteriile din genul *Bacillus* sau fungii din genul *Aspergillus*, elaborează pe lângă un mare număr de enzime intracelulare şi enzime extracelulare, pe care le secretă în mediul înconjurător. Enzimele

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

extracelulare sunt, în general, hidrolaze şi sunt secretate de microorganisme cu scopul de a degrada substraturile insolubile şi solubile cu molecule mari la compuşi solubili uşor asimilabili.

Este de reţinut faptul că factorii care determină înmulţirea şi dezvoltarea celulei vor determina şi declanşarea biosintezei enzimelor. Un rol important în formarea enzimei îl are existenţa în mediul de cultură a substratului care induce formarea enzimei specifice degradării respectivului substrat. El constituie inductorul operonului enzimei.

Primul studiu sistematic efectuat în această direcţie a fost efectuat de Karström (1955), care împarte enzimele în două grupe: enzime constitutive şi enzime adaptative.

Enzimele constitutive se sintetizează în celule în mod permanent. Concentraţia lor este însă influenţată de prezenţa sau absenţa în mediul de cultură a substraturilor pe care ele le metabolizează. Concentraţia acestor enzime poate să varieze şi sub influenţa altor factori: sursa de azot, sursa de carbon, factorii de creştere, sărurile minerale, temperatura, *p*H-ul etc.

În schimb, sinteza **enzimelor adaptative** este declanşată numai de prezenţa substraturilor specifice în mediul de cultură sau atunci când este nevoie de prezenţa lor în procesele metabolice.

Pe baza unor studii îndelungate şi de profunzime cu privire la biosinteza enzimelor induse de substrat s-a ajuns la următoarele concluzii:

– elaborarea de către un microorganism a unei enzime induse are loc numai în prezenţa inductorului; ca inductor funcţionează, de obicei, substratul care trebuie metabolizat; funcţia de inductor pot să o îndeplinească şi substanţele înrudite structural cu acesta, dar care nu pot îndeplini funcţia de substrat;

– biosinteza are loc pornind întotdeauna de la substanţe cu structură simplă;

– procesul de biosinteză decurge cu consum de energie şi din acest motiv, pe lângă substanţele necesare sintezei (aminoacizi, vitamine, diferiţi cationi), este nevoie în mediu şi de o sursă de carbon, de obicei un glucid;

– sinteza enzimelor induse are loc, de regulă, în timpul înmulţirii microorganismului; ea poate să aibă loc în starea staţionară, dacă sunt prezente inductorul şi substraturile de sinteză;

– procesul de biosinteză al enzimelor este inhibat de toate substanţele care inhibă biosinteza substanţelor proteice, de exemplu cloramfenicolul;

– biosinteza enzimelor induse este inhibată ori de câte ori în mediul de cultură este prezent un substrat uşor metabolizabil de către enzimele constitutive ale microorganismului;

– biosinteza unei enzime induse este inhibată selectiv şi de metaboliţii rezultaţi din reacţiile de transformare ale inductorului, datorită activităţii acestuia; fenomenul se numeşte *represie*.

Prin urmare, se poate spune că procesul de biosinteză a unei enzime induse este rezultatul acţiunii antagoniste a inductorului şi a metaboliţilor.

12.2. SELECŢIA TULPINILOR ŞI AMELIORAREA LOR

12.2.1. Alegerea tulpinii producătoare de enzime

Prima decizie importantă care trebuie luată într-un proces de producere a unei enzime cu ajutorul microorganismelor este alegerea unui organism producător corespunzător. Când se alege microorganismul potenţial producător de enzime, trebuie să se aibă în vedere următoarele:

– dacă enzima de interes este produsă intra- sau extacelular; avantajele şi dezavantajele care derivă din localizarea enzimelor au fost discutate în subcapitolele 1.4 şi 1.5. Când se aleg tulpinile de producţie, este de dorit să se testeze dacă enzimele de interes, după biosinteză, se găsesc numai în celule sau numai în mediul de cultură extracelular. Preferinţa pentru localizarea enzimei va fi dictată de stabilitatea enzimei, complexitatea mediului de producţie şi uşurinţa dezintegrării celulelor în vederea purificării enzimei de interes;

– există două zone de interes pentru păstrarea siguranţei mediului înconjurător şi a produsului enzimatic însuşi. Prima ar fi potenţiala ameninţare a tulpinii producătoare de către produşii de sinteză ai microorganismului folosit. A doua este potenţiala contaminare a preparatului enzimatic cu o tulpină patogenă sau cu toxine provenite de la microorganismul producător de enzime. Această din urmă restricţie are relevanţă mai mare asupra enzimelor utilizate în alimentaţie. Microorganismele folosite prin tradiţie în alimentaţia umană sunt deseori preferate pentru producerea de enzimă, datorită faptului că necesită mai puţine teste toxicologice comparativ cu alte surse microbiene. Nu este deloc întâmplător că multe enzime produse comercial sunt obţinute cu tulpini din genurile *Bacillus* şi *Aspergillus*, care, în general, sunt microorganisme nedăunătoare;

– microorganismul ales trebuie să fie capabil să crească în medii de cultură simple, ieftine şi care să nu necesite adăugarea de promotori de creştere scumpi, să fie stabil din punct de vedere genetic, să producă cantităţi mari din enzima dorită în cel mai scurt timp posibil, să fie uşor de separat din mediul de

biosinteză la sfârşitul fermentaţiei şi, dacă este cazul (pentru enzime intracelulare), să fie uşor dezintegrabil.

Multe microorganisme utilizate pentru producerea de enzime pot fi izolate din natură. De exemplu, microorganismele care hidrolizează lactoza pot fi găsite deseori asociate cu produse lactate, iar microorganismele celulozolitice pot fi izolate din produse lemnoase putrezite natural. Realizând o cultură îmbogăţită, aplicând procesul de selecţie unei specii luate din mediul natural, este posibil să se obţină culturi pure de microorganism producător de enzima dorită, dar foarte probabil în cantităţi mici.

O altă sursă de microorganisme producătoare de enzime sunt colecţiile de microorganisme realizate în multe laboratoare din lume [Lapage şi colab., 1970; Martin şi Skerman, 1972; Hesseltine şi Haynes, 1973], ATCC, WFCC, I..F.O. în ale căror cataloage sunt trecute tulpinile şi caracteristicile lor.

12.2.2. Ameliorarea tulpinilor de microorganisme

Este unanim recunoscut că, în general, microorganismele izolate din natură produc enzima dorită la niveluri prea scăzute pentru a fi folosite economic într-un proces de producţie. Din această cauză, ameliorarea genetică a microorganismului devine esenţială în punerea la punct a procesului de biosinteză a enzimei. Programul de ameliorare cuprinde, de regulă, câteva obiective:

– creşterea producţiei în enzima dorită;

– reducerea sau eliminarea enzimelor contaminante care pot cauza reacţii nedorite în anumite aplicaţii;

– modificarea metabolismului microorganismului producător astfel încât produsul dorit să fie biosintetizat în cantităţi mai mari decât sub influenţa unui posibil inductor scump, adăugat în mediu;

– organismul producător trebuie să producă enzima în condiţii normale de represie prin cataboliţi şi inhibiţie prin produs finit.

Pentru ameliorarea tulpinilor există trei metode principale folosite în mod curent:

– ***ameliorarea prin mutaţie şi selecţie***, utilizată, cu succes, în multe aplicaţii în microbiologia industrială de mulţi ani şi care a făcut subiectul multor lucrări de specialitate (Calam, 1964, 1970; Elander şi colab., 1977, Rowlands, 1983, 1984);

– ***hibridizarea***, care implică modificarea informaţiei genetice dintr-o celulă prin transferul de ADN de la altă tulpină;

– ***tehnologia ADN recombinant***, prin care informaţiile genetice aparţinând unei tulpini pot fi manipulate *in vitro* şi apoi inserate în aceeaşi sau în altă tulpină.

Mutaţia şi selecţia clasică. Procedura de bază în această metodă este de a supune o populaţie de microorganisme din tulpina care interesează unui tratament mutagen, cu scopul obţinerii unei populaţii de organisme viabile care sunt genetic modificate la întâmplare faţă de populaţia parentală. Mutageneza tipică este realizată prin expunerea tulpinii parentale radiaţiilor electromagnetice (UV, raze X, radiaţii γ) sau unor mutageni chimici ca: etilmetansulfonatul, etiletansulfonatul, metilmetansulfonatul, nitrozometilguanidina, nitrozoetilureea sau acidul azotos. Empiric, un nivel de tratament se stabileşte la o proporţie mare de letalitate şi la un procentaj mare de indivizi modificaţi genetic în populaţia supravieţuitoare. Supravieţuitorii sunt apoi izolaţi şi separaţi pentru ameliorarea caracterului dorit. În acest stadiu se cere în mod special intuiţie şi ingeniozitate pentru a alege eficient câteva mutante folositoare din mii de celule cu caractere nedorite. Cel mai bun mod de a rezolva aceasta constă în separarea celulelor pe un mediu solid corespunzător, ceea ce permite identificarea unui număr mare de supravieţuitori mutagenizaţi.

Explicaţia efectului mutagen atât al factorilor fizici cât şi al celor chimici este bine cunoscută; radiaţiile UV cu $\lambda = 254$ nm sunt puternic absorbite de ADN şi, ca urmare, multe microorganisme mor, iar la cele ce supravieţuiesc apar frecvente mutaţii induse. Efectul mutagen se datorează celor două tipuri de modificări chimice:

– hidratarea citozinei la nivelul dublei legături dintre atomii de carbon care poate persista suficient pentru a slăbi legătura de hidrogen cu purina complementară, determinând o separare localizată a catenei lezate şi apariţia unor mutaţii de tranziţie;

– formarea de legături covalente între resturile de pirimidină adiancente pe aceeaşi catenă (dimeri de pirimidină), care distorsionează macromolecula de ADN, interferând cu împerecherea normală a bazelor.

Agenţii chimici mutageni pot fi clasificaţi după modul lor de acţiune în trei categorii:

– analogi ai bazelor, care sunt încorporaţi în ADN şi produc erori de replicare (5-bromuracil);

– agenţi care modifică bazele nucleotidice în aşa fel încât produc erori de împerechere sau le fac susceptibile pentru modificări chimice spontane (acidul azotos, agenţii alchilanţi);

– agenţi care interacţionează cu ADN-ul şi cu structura sa secundară, producând distorsiuni locale ale moleculei, favorizând erori de replicare şi de recombinare (coloranţii de acridină). Hopwood (1970) a descris câteva metode de izolare a mutanţilor.

Tehnicile de cultivare continuă pot fi folosite pentru a selecţiona tulpini mutante cu activitate enzimatică modificată şi potenţial crescut de producţie (Smith

şi Dean, 1972; Harder şi colab., 1977; Melling, 1977; Sikyta şi colab., 1982, Dykhuizen şi Hartl, 1983).

Factorii de bază care guvernează selecţia mutantelor în cultură continuă privesc relaţiile dintre concentraţia substratului limitativ de creştere a organismelor prezente în chemostat în condiţii constante. Concentraţia substratului limitativ (S) este dată de rata de creştere (sau rata de diluţie într-un chemostat „steady-state") prin expresia:

$$S = K_S \frac{D}{\mu_{max} - D},$$

în care D este rata de diluţie (=μ, viteza specifică de creştere); μ_{max} – rata specifică maximă de creştere; K_s – o constantă de saturare egală cu concentraţia substratului când $\mu = 0{,}5 \cdot \mu_{max}$.

În figura 12.1 sunt schematizate curbele concentraţiei substratului în funcţie de rata de creştere pentru tulpina parentală (P) şi diferite tulpini mutante ipotetice M_1, M_2 şi M_3.

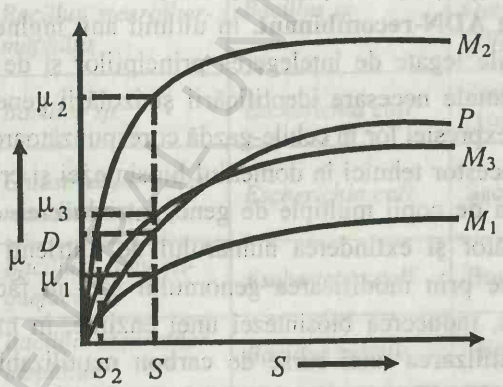


Fig. 12.1. Selecţia tulpinilor mutante în cultură chemostat (după G. M. Frost).

La o rată a diluţiei D, concentraţia nutrientului limitativ este S. Mutanta M_1, la această concentraţie a substratului, va avea o rată de creştere μ_1, iar când μ_1 este mai mic decât D, această mutantă va fi scoasă afară din chemostat şi nu va supravieţui. Mutanta M_2 poate creşte cu o rată μ_2, iar când μ_2 este mai mare decât D ea se va acumula rezultând o scădere a concentraţiei substratului la valoarea S_2. La această concentraţie, tulpina parentală va avea o rată de creştere mai mică decât D şi va fi scoasă din chemostat. Curba mutantei M_3 intersectează curba tulpinii parentale; în acest caz, la rate mici de diluţie, mutanta va supravieţui, în timp ce la diluţii ridicate mutanta va fi scoasă afară. Controlând natura şi concentraţia substratului limitativ şi rata de diluţie, se poate realiza îmbogăţirea populaţiei de microorganisme producătoare cu mutante mai performante.

În domeniul producției de enzime, astfel de tehnici au fost utilizate pentru selecția de tulpini înalt producătoare de β-galactozidază, D-serindeaminază, ribitoldehidrogenază, penicilinamidază (Sikyta și Kyslik, 1980), proteaze alcaline (Wang, Weimin, 1987, 1993).

Hibridizarea. La organismele care posedă un stadiu sexuat în ciclul lor de viață este posibil să se efectueze modificări genetice prin tehnici de hibridizare ca „conjugarea" – proces prin care ADN-ul dintr-o celulă bacteriană este transferat altei celule prin contact direct [Willetts, 1984] – sau „transformarea", prin care ADN-ul eliberat de către o celulă în mediul său de cultură este încorporat într-o altă celulă intactă [Stanisich, 1984]. Pe de altă parte, bacteriofagii pot fi utilizați la transferul de informații genetice prin procesul de „transducție", ADN-ul dintr-o celulă-donor fiind transferat unei celule-receptoare de către o capsidă de bacteriofag [Ozeki și Ikeda, 1968; Stanisich, 1984].

Organismele asexuate precum fungii imperfecți sau actinomicetele pot fi hibridizate utilizând tehnicile fuziunii de protoplaști (Pontecorvo și colab., 1951, Esser, 1974; Johnston, 1975; Ball și colab., 1978).

Tehnologia ADN-recombinant. În ultimii ani, ingineria genetică a făcut eforturi considerabile legate de înțelegerea principiilor și de punerea la punct a tehnicilor experimentale necesare identificării și izolării genelor, manipulării lor *in vitro*, clonării și expresiei lor în celule-gazdă corespunzătoare.

Aplicarea acestor tehnici în domeniul biosintezei și creșterii producției de enzime prin inserția de copii multiple de gene, introducerea caracterului dorit în organismul producător și extinderea numărului de nutrienți utilizabili de către tulpina producătoare prin modificarea genomului său au făcut progrese remarcabile. De exemplu, inducerea biosintezei unei enzime, în mod normal absente, poate să permită utilizarea unei surse de carbon neutilizabile sau posibilitatea expresiei unei gene specifice unei anumite enzime de la un organism donor la o tulpină receptoare, care poate crește pe medii simple și prezintă o mare atracție pentru producătorii de enzime. Cu toate că această tehnologie este în stadiu de dezvoltare, există o listă impresionabilă de gene pentru enzime de interes comercial care au fost clonate și au fost exprimate în diferite organisme-gazdă (tabelul 12.1).

Perfecționarea procedeelor de fermentație, sporirea gradului lor de eficacitate, descoperirea unui mare număr de bioconversii microbiene merg mână în mână cu utilizarea tehnicilor de recombinare genetică pentru îmbunătățirea tulpinilor și a tehnologiilor de obținere de substanțe biologic active și, în special, de preparate enzimatice de interes industrial.

În ceea ce privește procesele biotehnologice cele mai recente, ele se întemeiază atât pe tehnicile clasice cât și pe tehnicile de recombinare genetică și/sau folosirea enzimelor, a celulelor sau microorganismelor imobilizate.

Tabelul 12.1

Câteva gene care au fost manipulate *in vitro* în cazul unor enzime de real interes comercial

Gena producătoare de	Donor	Gazda	După
α-Amilază	*Bacillus sp.*	*Bacillus subtilis*	Pinches şi colab. (1985)
	Bacillus subtilis	*Bacillus subtilis*	Yamane şi Shinomya (1982)
α-Amilază (termostabilă)	*Bacillus stearothermophilus*	*Bacillus subtilis*	Mielenz şi Mickel (1982)
		Escherichia coli	
	Bacillus amyloliquefaciens	*Bacillus subtilis*	Polva (1984)
	Bacillus licheniformis	*Bacillus subtilis*	Joyet şi colab. (1984)
		Escherichia coli	
β-Amilază	*Bacillus stearothermophilus*	*Bacillus sp.*	Outtrup şi colab. (1984)
Celulaze	*Bacillus sp.*	*Escherichia coli*	Sashihara şi colab. (1984)
Celulază (endoglucanază A)	*Chlostridium thermocellum*	*Escherichia coli*	Sacco şi colab. (1984)
β- Glucanază	*Bacillus amyloliquefaciens*	*Escherichia coli*	Borriss şi colab. (1985)
Lactază (termostabilă)	*Bacillus stearothermophilus*	*Bacillus subtilis*	Hirata şi colab. (1985)
Pectinaze	*Erwinia carotovora*	*Escherichia coli*	Zink şi Chatterjee (1985)
Penicilin V amidază	*Bacillus sphericus*	*Escherichia coli*	Olsson şi colab. (1985)
		Bacillus subtilis	
Peptidază	*Pseudomonas sp.*	*Sacharomyces cerevisiae*	Clarke şi colab. (1985)
Proteinază	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus subtilis*	Okada şi colab. (1984)
Xilanază	*Bacillus pumilus*	*Escherichia coli*	Panbangred şi colab. (1985)
		Bacillus subtilis	
	Aeromonas sp.	*Escherichia coli*	Kudo şi colab. (1985)
Xilozizomerază	*Escherichia coli*	*Schizosaccharomyces pombe*	Ueng şi colab. (1985)

După Sansson, expresiile *recombinări genetice in vitro* sau chiar *recombinarea ADN* sunt de preferat expresiilor *manipulări genetice* sau *inginerie genetică*. După *National Institute of Health* ale S.U.A., moleculele de *ADN recombinat* sunt molecule de ADN sintetizate în afara celulelor vii prin legarea unor segmente de ADN natural sau sintetic cu moleculele care pot să se replice într-o celulă vie. Principiul constă în a reuni un ADN *nativ* şi un ADN *străin* într-un *vector* care este un *plasmid* bacterian sau un genom viral şi a-l introduce apoi într-o *celulă-gazdă*, unde se poate înmulţi. Rezultatul este o clonă de celule *transformate*.

Unul dintre obiectivele *bioindustriei* este de a avea la dispoziţie *celule transformate* în stare să exprime mesajul genetic *străin* pe care ele l-au înregistrat şi, deci, apte să producă molecule proteice specifice în cantitate mare.

Dezvoltarea biotehnologiilor şi utilizarea tehnicilor de inginerie genetică în biotehnologie se întemeiază în mare măsură pe existenţa unor laboratoare bine dotate de cercetări microbiologice, genetice, biochimice, enzimologice, de biologie moleculară şi, de asemenea, pe existenţa unei culturi inventariate şi studiate regulat. În plus, orice aplicaţie biotehnologică este condiţionată de cunoaşterea aprofundată a caracteristicilor tulpinilor microbiene. Mai mult, în măsura în care aceste tulpini vor putea deveni obiectul unei protecţii prin brevete, ele vor reprezenta cheia oricărei dezvoltări, atât la nivelul cercetării fundamentale, cât şi la cel al cercetării aplicate şi al bioindustriei.

Conceptul de inginerie a genelor („genetic ingineering") este utilizat pentru a desemna preocupări privind manipularea genelor, inserţia genelor, ingineria plasmidelor, tehnologia genelor etc.

Tehnicile prin care se realizează manipulare directă a ADN-ului prin clonare moleculară (tehnologia ADN recombinat), având ca model transferul unor gene din celula animală în celule bacteriene cuprind mai multe etape:

– izolarea genelor naturale sau sinteza chimică a unor molecule de ADN, care codifică proteinele dorite;

– selecţia unui „vehicul" sau vector adecvat, capabil să transforme genele respective şi apt să se replice autonom în celula receptoare;

– asigurarea condiţiilor care permit exprimarea informaţiei genetice străine în celula bacteriană;

– inserţia genelor străine în structura genetică a moleculei vector şi obţinerea unei himere moleculare;

– introducerea acesteia într-o celulă bacteriană şi transformarea ei;

– selectarea celulelor modificate genetic din populaţia de celule rezultate prin multiplicare.

12.2.3. Creşterea producţiei de enzime prin ameliorarea tulpinilor

În domeniul producţiei enzimelor de interes comercial, sunt rare publicaţiile referitoare la ameliorarea tulpinilor, acestea constituind secrete de fabricaţie. Faith şi colab. au prezentat date care arată că numărul factorilor ce influenţează creşterea producţiei de enzime variază între 2 şi 500 [Faith şi colab., 1971]. De exemplu, producţia de celulaze a fost îmbunătăţită prin tehnicile descrise mai înainte (Cuskey şi colab., 1982; Ghosh şi colab., 1984) şi apoi s-a aplicat în practică. Îmbunătăţirea potenţialului productiv al tulpinii se face în stadiile iniţiale ale cercetării şi apoi se efectuează un calcul economic şi, dacă tehnologia este rentabilă, se aplică industrial.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

13. ENZIME AMILOLITICE

Multe procese industriale folosesc enzime amilolitice pentru a hidroliza amidonul înaintea utilizării acestuia în procese fermentative sau în alte procese biochimice.

Există mai multe tipuri de enzime capabile să hidrolizeze amidonul. Acestea pot ataca atât amidonul solubil, cât şi granulele de amidon aflate în suspensie apoasă. În funcţie de utilizările ulterioare ale hidrolizatului de amidon, se stabilesc condiţiile optime de realizare a hidrolizei enzimatice. Aceasta poate fi parţială sau totală. Gradul de hidroliză care se doreşte să se obţină dictează alegerea unui anumit sistem de enzime amilolitice. Pe de altă parte, înaintea desemnării unui sistem de hidroliză potrivit, este necesară cunoaşterea fenomenelor care influenţează cinetica procesului de hidroliză desfăşurat în prezenţa sistemului de enzime ales. Este cunoscut faptul că produşii finali rezultaţi în urma hidrolizei enzimatice a amidonului inhibă procesul printr-un mecanism atât competitiv cât şi necompetitiv după unii autori, sau produc o inhibiţie exponenţială simplă după alţi autori.

α-Amylase [E.C. 3.2.1.1]. Hidrolizează legăturile 1,4-α-D-glicozidice în polizaharide care conţin 3 sau mai multe unităţi de D-glucoză unite prin legături α-1→ 4. Acţionează asupra glicogenului şi oligo- şi polizaharidelor înrudite. Denumirea sistematică este 1,4-α-D-glucan glucanohidrolază.

β-Amylase [E.C. 3.2.1.2]. Scindează amidonul, glicogenul, polizaharide şi oligozaharide producând β-maltoză. Denumirea sistematică este 1,4-α-D-glucan maltohidrolază.

Existenţa unor enzime care transformă amidonul în „zahăr" (de fapt într-un amestec de glucide) este cunoscută de mult. Amilaza (sub denumirea veche „diastaza") din bobul de orz a fost obţinută sub forma unui extract apos încă din 1811, de către Kirchoff, iar cea din salivă a fost descoperită de Leuchs, în 1831. Enzimele amilolitice (amilazele) sunt mult răspândite în natură, atât în regnul vegetal cât şi în cel animal. În general, amilazele apar oriunde se găseşte amidon,

de exemplu în cartofi, cereale, fasole, soia. Cantităţi mai mari de amilaze, alături de alte enzime apar în boabele de fasole germinate. La animalele superioare amilazele se găsesc în concentraţie mai mare în pancreas, iar la unele specii în salivă.

O sursă importantă de enzime amilolitce descoperită mult mai târziu (1950–1960) o constituie microorganismele. Cea mai stabilă şi utilizată sursă este *Bacillus subtilis*, care a fost primul microorganism cultivat în scopul producerii de amilaze, la început în culturi de suprafaţă şi apoi pe medii lichide, în fermentaţii submerse (Underkofler, 1976). În prezent, se cunosc mai multe microorganisme producătoare de enzime amilolitice, aparţinând diferitelor clase sistematice: bacterii, drojdii, fungi.

Astfel, preparatele enzimatice amilolitice de origine microbiologică au invadat piaţa comercială, cele de extracţie producându-se în prezent în cantităţi mult mai mici.

13.1. MODUL DE ACŢIUNE AL ENZIMELOR AMILOLITICE ASUPRA AMIDONULUI

Amidonul, glicogenul, polizaharidele şi oligozaharidele reprezintă substratul natural al enzimelor amilolitice. După cum se cunoaşte, amidonul nu este o substanţă omogenă, ci un amestec de două tipuri de polizaharide: amiloză şi amilopectină. Amiloza este formată din polizaharide ce conţin resturi de glucoză unite între ele prin legături 1,4-α-glicozidice. Gradul de polimerizare variază între 100 şi 2000, iar moleculele au o structură helicală, cu spire formate din 6 molecule de glucoză legate prin punţi de hidrogen. În interiorul spirelor se formează un tub de aproximativ 5Å. În interiorul tubului pot pătrunde molecule de dimensiuni mai mici formând combinaţii de incluziune. O astfel de combinaţie, de culoare albastră, de importanţă practică deosebită, o formează iodul care pătrunde în interiorul tubului. Această reacţie stă la baza recunoaşterii amidonului, fiind utilizată în multe metode de dozare calitativă a acestuia. Când macromoleculele de amiloză au un grad înalt de polimerizare, acestea prezintă şi puncte de ramificare, reduse la număr, prin legături 1,3-α-glicozidice (fig. 13.1).

Amilopectina, a doua componentă a amidonului, formează macromolecule ramificate din lanţuri de amiloză scurte (18–26 resturi de glucoză) unite prin legături 1,6-α-glicozidice (fig. 13.2), gradul de polimerizare variind între 6000 şi 36 000.

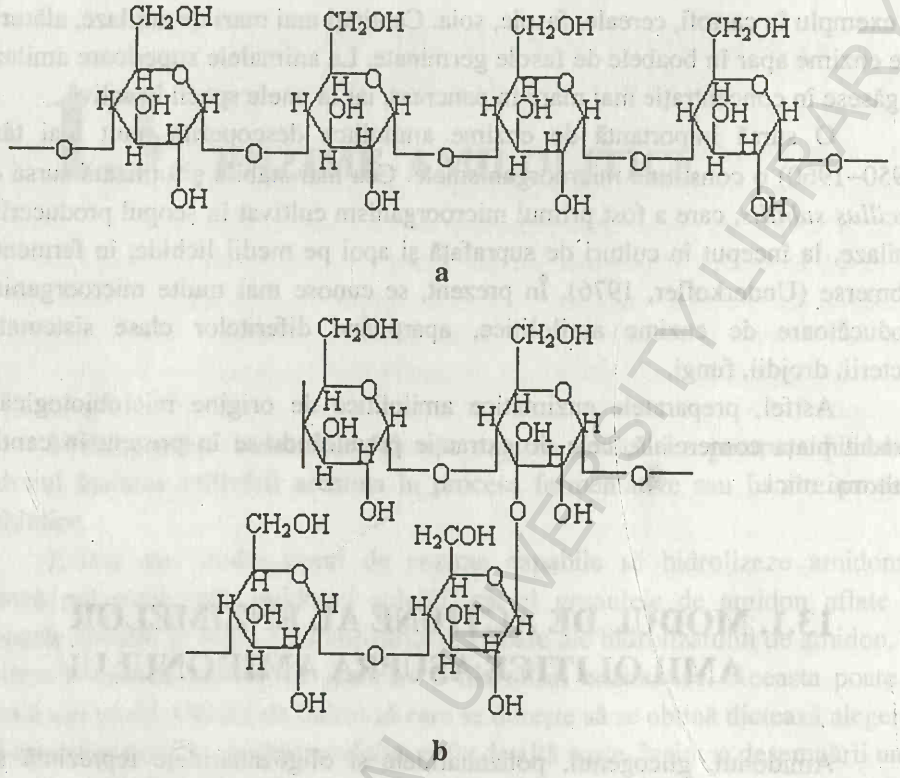


Fig. 13.1. Structura amilozei; reprezentarea legăturilor 1,4-α-glicozidice şi 1,3-α-glicozidice din macromoleculele mari de amiloză (1000–2000 resturi de glucoză):
a – reprezentarea legăturilor 1,4-α-glicozidice din amiloză; *b* – reprezentarea legăturilor 1,3-α-glicozidice din macromoleculele mari de amiloză.

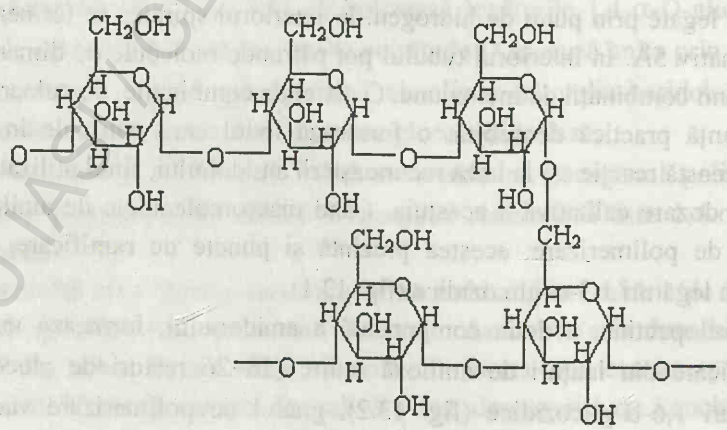


Fig. 13.2. Structura amilopectinei; reprezentarea legăturilor 1,6-α-glicozidice în punctele de ramificare.

BCUIA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După cum se poate observa, în structura amidonului există patru tipuri de legături deosebite:

– legături 1,4-α-glicozidice din interiorul macromoleculelor de amiloză şi amilopectină;
– legături 1,4-α-glicozidice marginale;
– legături 1,3-α-glicozidice;
– legături 1,6-α-glicozidice (de ramificare).

În consecinţă, pentru hidroliza completă a amidonului, până la glucoză, este necesară existenţa a patru enzime, după cum se poate urmări în tabelul 13.1.

Tabelul 13.1

Enzime implicate în hidroliza completă a amidonului

Denumirea uzuală a enzimei	Denumirea sistematică	Codul I.U.B.	Tipul de legătură asupra căreia acţionează
α-Amilază	1,4-α-D-Glucan glucanohidrolază	E.C.3.2.1.1.	1,4-α-Glicozidice interioare
β-Amilază	1,4-α-D-Glucan maltohidrolază	E.C.3.2.1.2.	1,4-α-Glicozidice marginale
Amiloglucozidază (glucoamilază)	1,4-α-D-Glucan glucohidrolază	E.C.3.2.1.3.	1,3-α-Glicozidice
Glucozidaze (pullulanaza, izoamilaza)	α-Dextrin-6-glucanohidrolază Sucroză-α-D-glucohidrolază	E.C.3.2.1.4.1 E.C.3.2.1.6.8	1,6-α-Glicozidică 1,6-α-Glicozidică din pullulan 1,6-α-Glicozidică din zaharoză şi maltoză

Utilizarea separată a preparatelor enzimatice amilazice conţinând una dintre enzimele menţionate anterior conduce la o hidroliză incompletă a amidonului. Datorită condiţiilor diferite în care acţionează fiecare enzimă şi a substratului specific pe care îl atacă, în majoritatea cazurilor, hidroliza enzimatică a amidonului se efectuează practic în două etape:

– în prima etapă are loc o fragmentare rapidă a macromoleculelor de amiloză şi amilopectină până la fracţiuni cu greutăţi moleculare mai mici – dextrinele (operaţia se numeşte dextrinizare). Această etapă se realizează cu preparate enzimatice α-amilazice;

– în a doua etapă, dextrinele sunt hidrolizate complet la oligozaharide şi apoi la maltoză şi glucoză în funcţie de compoziţia preparatului utilizat (operaţia se numeşte zaharificare). Această etapă se realizează cu preparate enzimatice conţinând celelalte 3 tipuri de enzime (β-amilază, amiloglucozidază, glucozidaze). Astfel, toate preparatele comerciale α-*amilazice* produc numai o hidroliză parţială

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a amidonului, până la un grad de circa 20–30%, faza a doua realizându-se cu alte tipuri de amilaze (numite impropriu „β-amilaze" deşi se ştie că sunt un amestec de mai multe enzime).

Acţiunea hidrolitică a amilazelor asupra amidonului se recunoaşte prin două semne exterioare: în prima etapă (dextrinizare) amidonul se lichefiază (se fluidizează), această fază purtând şi denumirea de „lichefiere" şi, apoi, în etapa a doua (zaharificare) se dizolvă în apă.

Un alt criteriu de stabilire a gradului de hidroliză a amidonului poate fi pus la punct prin determinarea conţinutului în glucide reducătoare, printr-o metodă oarecare. După acţiunea α-amilazelor, concentraţia în glucide reducătoare este de aproximativ 1/3 din concentraţia iniţială a amidonului; după etapa a doua de hidroliză efectuată cu β-amilaze, dacă hidroliza este completă, concentraţia în glucide reducătoare este egală cu cea a amidonului (supus iniţial procesului de hidroliză).

13.2. TEHNOLOGII DE BIOSINTEZĂ A α-AMILAZELOR

α-Amilaza este o enzimă ce face parte din clasa hidrolazelor şi anume, conform clasificării I.U.B., din grupul „glicozidaze" 3.2.1.

Microorganismele cele mai utilizate pentru biosinteza α-amilazelor sunt bacteriile şi fungii, astfel încât se deosebesc α-amilaze bacteriene şi fungice.

13.2.1. Biosinteza α-amilazelor bacteriene

α-Amilazele bacteriene hidrolizează parţial amidonul, păstrând configuraţia α a atomului anomeric de carbon în produşii de reacţie. Fragmentele de amidon rezultate în urma hidrolizei se numesc dextrine. Operaţia de hidroliză cu α-amilaze se numeşte dextrinizare. În industrie, această operaţie se mai numeşte fluidificare, datorită fenomenului de fluidificare a suspensiei de amidon, la sfârşitul operaţiei.

13.2.1.1. Microorganisme producătoare de α-amilaze

În general, α-amilazele bacteriene sunt enzime termostabile. Cea mai importantă sursă de α-amilază bacteriană o constituie speciile din genul *Bacillus* şi anume *Bacillus subtilis* şi *Bacillus amyloliquefaciens*. Aceste tulpini produc α-amilaze cu proprietăţi similare, dar cu reacţii imunologice diferite. Primele preparate comerciale apărute pe piaţă conţineau enzime bacteriene produse de aceste specii. Mai târziu au apărut preparate enzimatice conţinând enzime cu înaltă termostabilitate produse de speciile *B. licheniformis* şi *B. stearothermophilus*.

Tabelul 13.2

Preparate comerciale de amilaze bacteriene şi fungice

Denumirea comercială	Tipul de enzimă şi sursa	Forma de prezentare	*p*H optim de acţiune	Temperatura optimă, °C (sau domeniul)	Activitatea (unităţi proprii)	Aplicaţii şi însuşiri speciale
1	2	3	4	5	6	7
Nervanase	α-Amilază bacteriană, *Bacillus subtilis*	Pudră/ Lichid	5,8	75…90	300–10 000 SKB/g	Conversia amidonului
Amylozyme	α-Amilază fungică *Aspergllus oryzae*	Lichid/ Pudră	5,5	60…65	30 000 SKB/g 450–6000 SKB/g	Zaharificare maltozică
Ambazyme	Amiloglucozidază fungică *Aspergillus niger*	Lichid/ Pudră	4,7	63…70	50–120 AG/g	Siropuri de amidon, dextroză, industria alimentară
β-Glucanase	β-Glucanază bacteriană *Bacillus subtilis*	Lichid	7	55…70	200 BGU/g	Industria alimentară, prepararea berii
β-Glucanase	β-Glucanază fungică, *Penicillum emersonii*	Lichid/ Pudră	4	30…90	200 şi 750 BGU/g	Industria alimentară, prepararea berii
Allcoholase I	α-Amilază bacteriană *Bacillus subtilis*	Lichid/ Pudră	6,5	77	200 unităţi	Conversia amidonului

BCU "I. CREANGĂ" UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.2 (continuare)

1	2	3	4	5	6	7
Allcoholase II	Amiloglucozidază fungică *Rhizopus niveus*	Pudră	3,5–4,0	30…50	400 unități	Criotolerant pentru fermentația alcoolică
Sbozzimante SPC	α-Amilază bacteriană	Lichid	6,5	70	60 000 unități	Industria textilă
Canalpha	α-Amilază bacteriană	Lichid/ Pudră	5,5–6,5	75…85	–	Lichefierea amidonului
Bioferm	α-Amilază fungică	Lichid	4–5	40…50	–	Zaharificare dextrogenică
Amylo	Amiloglucozidază fungică	Lichid/ Pudră	4–5	55…65	–	Zaharificare alcoolică
Bioglucanase	β-Glucanază	Lichid/ Pudră	4–6	65…75	–	Industria berii
Biase	α-Amilază și β-amilază	Lichid/ Pudră	5–7	60…75	–	Industria farmaceutică, alimentară
Rhozyme GC2x; 86L H39	α-Amilază bacteriană *Bacillus subtilis*	Lichid/ Pudră	5–7	80	12 500–210 000 FM	Industria alimentară, textilă
Spezyme	α-Amilază bacteriană *Bacillus subtilis*	Pudră	–	–	–	–
Spezyme	Amiloglucozidază fungică	Pudră	–	–	–	–

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.2 (continuare)

1	2	3	4	5	6	7
Amylase THC	α-Amilază bacteriană	Pudră	7–8	60…70	–	Industria detergenților
Bactamyl-Rapidase	*Bacillus subtilis*	Lichid/ Pudră	–	70	–	Industria textilă
Dexlo		Lichid/ Pudră	6,5	85…90	–	Industria amidonului
Maxamyl		Lichid	6,5	85…90	–	Industria amidonului
Brewer`s Amyliq		Lichid	6,5	70	–	Industria berii
Amylase P	α-Amilază fungică *Aspergillus oryzae*	Pudră	–	–	500–500 000 PS_{50}/g	Industria de panificație
Filtrase AM	Glucanaze bacteriene *Bacillus subtilis*	Pudră	6,8	44	–	Industria berii
Maxatase M	Amilaze și proteaze bacteriene *Bacillus subtilis*		9–10	50…70	–	Industria de detergenți
Brewer`s Mylase SR	α-Amilază și amiloglucozidază	Pudră	5,2	50…52	25 000 PS_{50}/g	Industria berii
Pamylase	α-Amilază și protează fungică *Aspergillus oryzae*	Pudră	–	–	–	Industria de panificație
Agidex	Amiloglucozidaze fungice *A. niger*	Lichid	4,5	60…65	3000–8000 Unit. Glaxo/ml	Conversia amidonului
Barley β-glucanase	Glucanaza fungice *Penicillium emersonii*	Lichid	4,0	65…95	200 Unit. Glaxo/ml	Industrii fermentative

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.2 (continuare)

1	2	3	4	5	6	7
Godo-BXA	α-Amilază bacteriană	Pudră	5,6	80	20 000 G/g	Calciu pentru stabilitate termică; industria amidonului
MKC α-amilase, Amylase HT Series	α-Amilază bacteriană *Bacillus subtilis*	Pudră	5,0–7,5	Peste 90	Concentrată 2 100 000 MWU/g 700 000 MWU/g 30 000 MWU/g	Bere, panificație, distilare, furajarea animalelor, textile, hârtie, farmacie, fermentații
MKC α-Amilase L	*Bacillus subtilis*	Lichid	5,0–7,5	Peste 90	420 000 MWU/g	Bere, panificație, furajarea animalelor, farmacie, fermentații
Optiamyl-L	*Bacillus subtilis*	Lichid	5,0–7,5	Peste 90	420 000 MWU/g	Industria amidonului
Optimash-L	*Bacillus subtilis*	Lichid	5,0–7,5	Peste 90	420 000 MWU/g	Distilare
Optisize-L	*Bacillus subtilis*	Lichid	5,0–7,5	Peste 90	420 000 MWU/g	Textile
Amylase-LP	*Bacillus subtilis*	Lichid	5,0–7,5	Peste 90		Industria hârtiei
MKC Amylase LT	*Bacillus lchenformis*	Lichid	5–8	90…105	420 000 MWU/ml	Furajarea animalelor, bere, textile, hârtie, farmacie, fermentații
MKC Fungal Amylase Clarase	α-Amilază fungică *Aspergillus oryzae*	Pudră Lichid	4,0–6,6	Peste 60	40 000 SKB/g 5000 SKB/g 40 000 SKB/ml	Panificație, sucuri de fructe, industria amidonului
MKC Dextrinase A	–	Pudră	5–5,3	55	Pudră standardizată	Industria amidonului, conversia siropului acid la 62-65DE glucoză/ maltoză sirop
MKC Glucoamylase	Amiloglucozidaze fungice *Aspergillus niger*	Lichid	3,8–4,5	55…60	200 GAU/ml 150 GAU/ml 160 GAU/ml 100 GAU/ml	Panificație, industria amidonului, berii, textilă, hârtiei, furajarea animalelor, farmacie, fermentații

Tabelul 13.2 (continuare)

1	2	3	4	5	6	7
Takamine fungal amylase	α-Amilază fungică *Aspergillus oryzae*	Pudră Lichid	4,0–6,6	peste 60	40 000 SKB/g 5000 SKB/g 40 000 SKB/ml	Panificație
Takamyl	α-Amilază fungică *Aspergilus oryzae*	Pudră	4,0–6,6	peste 60	40 000 SKB/g	Panificație, sucuri de fructe, distilare, industria berii, amidonului
Diazyme	Amiloglucozidaze fungice *Aspergillus niger*	Lichid	3,8–4,5	55…60	200 GAU/ml 150 GAU/ml 100 GAU/ml 160 GAU/g	Panificație, industria amidonului, distilare, furajarea animalelor, industria textilă, hârtiei, farmacie, fermentații
Aquazym BAN	α-Amilază bacteriană *Bacillus subtilis*	Lichid/ Pudră/ Granule	6–7	70	120–1000 KNU/g	Alcool, panificație, bere, detergenți, alimente, hârtie, industria amidonului şi textilă
Termamyl	*Bacillus licheniformis*	Lichid/ Granule	6–7,5	90…105	60 şi 120 KNAAU/g	Alcool, bere, detergenți, alimente, hârtie, industria amidonului, zahărului, textilă
Fungamyl	α-Amilaze fungice *Aspergllus oryzae*	Lichid/ Pudră	5	55	180–1600 FAU/g	Alcool, panificație, bere şi industria amidonului
Cereflo	β-Glucanază bacteriană *Bacillus subtlis*	Lichid	6,5–7,5	55…60	200 BGU/g	Bere, alimentație
Finizym	β-Glucanază fungică *Aspergillus niger*	Lichid	5	60	200 BGU/g	Bere, alimentație

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Diferențele dintre α-amilazele produse de *Bacillus amyloliquefaciens* și cele produse de *B. licheniformis* constau în compoziția diferită a hidrolizatului de amidon obținut cu aceste enzime. Astfel, primul conține maltohexoze drept component major, iar în al doilea caz se obține un amestec de maltohexoze și maltoză.

În mod asemănător, în funcție de specia bacteriană utilizată în procesul de biosinteză, compoziția în oligozaharide a produsului de reacție este diferită, deși, per global, gradul de hidroliză calculat prin determinarea cantității de glucide reducătoare obținute în urma hidrolizei enzimatice raportate la cantitatea totală de substrat (amidon) utilizat este aproximativ același (20–25%).

În 1983, Fogarty a efectuat o recenzie completă a enzimelor microbiene care hidrolizează amidonul (tabelul 13.2).

13.2.1.2. Influența etapelor de cultivare a microorganismelor asupra biosintezei α-amilazei

Când tulpina producătoare este cultivată în sistem discontinuu, enzima este produsă în mod normal după ce a atins faza maximă de creștere și începe faza staționară. S-au postulat diferite ipoteze privind asocierea fazei de sporulare cu schimbările fiziologice. S-a constatat că, în timpul biosintezei enzimei, are loc o represie prin catabolit, astfel încât nivelul de producere a enzimei este limitat de concentrația sursei de carbon. În 1975, Saito și Yamamoto au demonstrat inducerea formării enzimei de către amidon concomitent cu represia prin catabolit la *B. licheniformis*. Ei au selecționat mutanți rezistenți la represia prin catabolit. În 1984, Vortruba și colaboratorii au găsit că producerea α-amilazei în sistem continuu este proporțională cu viteza de creștere și este represată de concentrația în glucide reducătoare.

În final, majoritatea autorilor au acceptat ideea că biosinteza α-amilazelor are loc la sfârșitul fazei logaritmice, înainte de atingerea fazei staționare.

Producerea α-amilazelor cu tulpini de *Bacillus subtilis* este influențată de particularitățile morfo-fiziologice corelate cu potențialul productiv al tulpinii. Tulpinile de *Bacillus subtilis* prezintă fenomenul de disociere *R-S*, *P*, *M* în anumite condiții. Forma *R* tipică este activă cu potențial enzimatic ridicat, în timp ce formele *S*, *P*, *M* sunt slab active sau inactive. Aceasta impune o limitare a variabilității, prin selecția permanentă a coloniilor de tip *R* înalt productive, evitarea repicărilor repetate și utilizarea de inocul preparat de fiecare dată din cultura stoc.

Dinamica acumulării α-amilazei în culturi submerse, în sistem discontinuu, este reprezentată în figurile 13.3, 13.4 și 13.5.

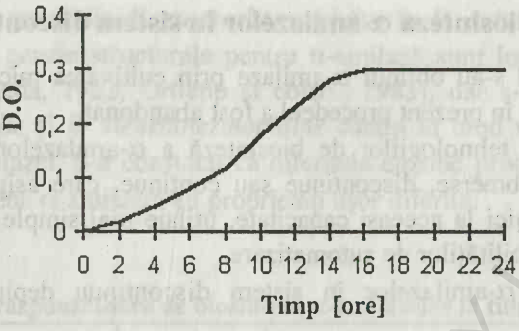


Fig. 13.3. Dinamica acumulării de biomasă în culturi submerse de *Bacillus subtilis*.

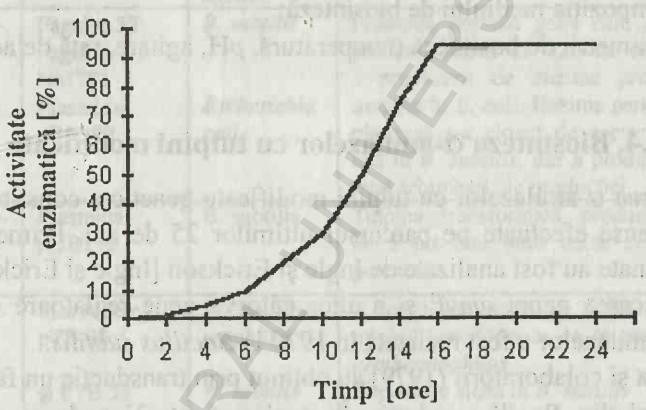


Fig. 13.4. Dinamica activității enzimatice în culturi submerse de *Bacillus subtilis*.

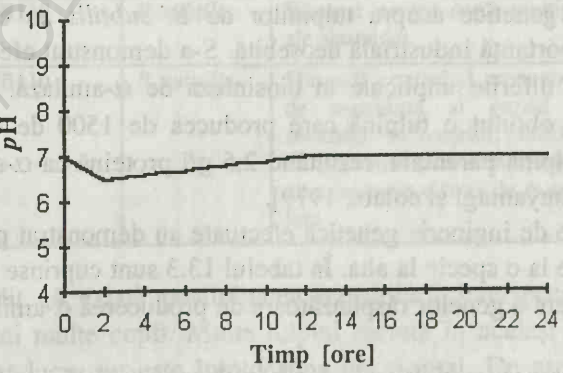


Fig. 13.5. Evoluția *p*H-ului în culturi submerse de *Bacillus subtilis*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

13.2.1.3. Biosinteza α-amilazelor în sistem discontinuu submers

Deşi, iniţial s-au obţinut α-amilaze prin cultivarea microorganismelor în culturi de suprafaţă, în prezent procedeul a fost abandonat.

Majoritatea tehnologiilor de biosinteză a α-amilazelor bacteriene au la bază procedeele submerse, discontinue sau continue, care asigură productivităţi sporite, suprafeţe mici la aceeaşi capacitate, utilaje mai simple şi exploatare mai uşoară datorită posibilităţilor de automatizare.

Biosinteza α-amilazelor în sistem discontinuu depinde de următorii parametri:

- starea fiziologică a microorganismului utilizat;
- potenţialul productiv al tulpinii folosite;
- compoziţia mediului de biosinteză;
- parametrii de bosinteză (temperatură, *p*H, agitare, rată de aerare, durata cultivării).

13.2.1.4. Biosinteza α-amilazelor cu tulpini modificate genetic

Obţinerea α-amilazelor cu tulpini modificate genetic a constituit subiectul unor studii intense efectuate pe parcursul ultimilor 25 de ani. Primele studii cu tulpini recombinate au fost analizate de Ingle şi Erickson [Ingle şi Erickson , 1978].

Identificarea genei *amy*E şi a altor câtorva gene reglatoare implicate în producerea α-amilazelor a fost realizată în 1979 la *Bacillus subtilis*.

Namura şi colaboratorii (1979) au obţinut prin transducţie un fag conţinând gena α-amilazei din *Bacillus subtilis*. În acelaşi timp, Yoneda şi colaboratorii [Yoneda şi colab., 1979] au utilizat un fag pentru a transfera gena pentru producerea de α-amilază de la *B. amyloliquefaciens* la o mutantă de *B. subtilis* care nu sintetiza α-amilază.

Studiile genetice asupra tulpinilor de *B. subtilis* au continuat, întrucât acestea au o importanţă industrială deosebită. S-a demonstrat efectul sinergic a cel puţin şase gene diferite implicate în biosinteza de α-amilază. Hitotsuyamagi şi colaboratorii au obţinut o tulpină care producea de 1500 de ori mai multă α-amilază decât tulpina parentală, rezultând 2,5 g/l proteină ca α-amilază în mediul de cultură [Hitotsuyamagi şi colab., 1979].

Lucrările de inginerie genetică efectuate au demonstrat posibilitatea transferării genelor de la o specie la alta. În tabelul 13.3 sunt cuprinse date referitoare la lucrările de clonare a genelor răspunzătoare de producerea α-amilazei, la tulpini de *Bacillus spp.*

Studiile genetice efectuate au arătat că, atunci când genele α-amilazei sunt clonate în *E. coli*, ele se exprimă, enzima acumulându-se în spaţiul periplasmatic.

În general, celulele de *Bacillus subtilis* transformate biosintetizează eficient şi secretă α-amilaze de la alte specii. Cu toate acestea s-a constatat o

exprimare slabă a genei din *B. stearothermophilus* în *B. subtilis* [Aiba şi colab., 1983]. De obicei, genele structurale pentru α-amilază sunt localizate în ADN-ul cromozomal [Yoneda, 1982, Ortlepp şi colab., 1983], dar s-a găsit că anumite tulpini de *B. subtilis* şi *B. stearothermophilus* conţin în mod natural plasmide ce conţin gena α-amilazei. S-a constatat că diferitele enzime produse de tulpini care au în cromozom gena α-amilazei au proprietăţi uşor diferite.

Tabelul 13.3

Clonarea genelor răspunzătoare de biosinteza α-amilazelor la tulpini de *Bacillus spp.*

Donorul	Vectorul	Gazda	Observaţii	După
Bacillus subtilis	Fagul p11	*Bacillus subtilis*	Detectarea calitativă a expresiei	Nomura şi colab., 1979
Bacillus amyloliquefaciens *B. coagulans*	Fagul φ 3T Fagul λ NM781 Plasmida pBR322	*B. subtilis* *Escherichia coli*	Plasmida purtând gena care a produs mărirea de 320 de ori a producerii de enzime prin transfer în *E. coli*. Enzima periplasmică s-a clonat de asemenea în *B. subtilis*, dar a produs mici schimbări ale producţiei	Yoneda şi colab., 1979 Colson şi colab., 1981
Bacillus amyloliquefaciens	Plasmida pUB110	B. subtilis	Tulpina transformată produce de 5 ori mai mult decât cea parentală.	Palva, 1982
B. stearothermophilus	Plasmidele pTB 90 şi PTB 53	*B.stearothermophilus* *B. subtilis*	A mărit activitatea de 5 ori a tulpinii transformate de *B. stearothermophilus* Exprimare slabă în *B. subtilis*	Aiba şi colab., 1983
B. licheniformis	Fagul XL47 Plasmida pBR322, pUB110	*E. coli* *B. subtilis*	Clonare în *E. coli* utilizând fag. Subclonare din *E. coli* în plasmide pentru transformarea lui *B. subtilis*	Joyet şi colab., 1984
B.amyloliquefaciens	pUB110	*B. subtilis*	Brevetat pentru copii multiple ale plasmidei	Palva, 1984
B.amyloliquefaciens	pUB110	*B. subtilis*	Plasmidă conţinând promotorul de α-amilază al gazdei şi semnalul secvenţelor; utilizat, de asemenea, pentru exprimarea altor proteine alături de α-amilază.	Ulmanen şi colab., 1985

S-a dovedit că există posibilitatea transferării interspecifice a genei şi multiplicării în mai multe copii. Multe tulpini secretă în acelaşi timp amilaze şi proteaze, dar acest lucru nu este întotdeauna un avantaj. De asemenea, dacă se transferă gena termostabilă α-amilazei la tulpini mezofile producătoare de proteaze, este posibil să se aplice un tratament simplu de încălzire a produsului brut, pentru a inactiva proteaza, fără a afecta termostabilitatea α-amilazei. Acest

fapt a fost ilustrat prin transferul genei de la *B. licheniformis* la *B. subtilis*. De asemenea, s-au clonat fragmente de ADN din *B. subtilis* sau din *B. amyloliquefaciens* şi s-au utilizat pentru mărirea cantităţii de α-amilază secretată.

În general, genul *Bacillus* produce α-amilaze, dar s-a găsit o enzimă din *B. stearothermophilus* care acţionează mai mult ca o β-amilază decât ca o α-amilază.

13.2.1.5. Compoziţia mediului şi parametrii de biosinteză

Biosinteza α-amilazelor este influenţată de compoziţia mediului nutritiv şi de condiţiile de cultivare a microorganismului (temperatură, *p*H, durata fermentaţiei). Ca sursă de carbon se pot utiliza diferite varietăţi de amidon (tabelul 13.4). Cele mai bune rezultate se obţin în cazul utilizării glicogenului şi a maltotetraozelor. Maltotriozele sunt, de asemenea, utilizate. Dintre dizaharide, maltoza este utilizată, dar rezultatele sunt de cinci ori mai slabe decât în cazul utilizării glicogenului ca sursă de carbon. Dacă se utilizează monozaharide, se obţin cantităţi foarte mici de α-amilază.

Sursele de azot folosite sunt universale: săruri de amoniu, aminoacizi, cazeină. Pentru *B. coagulans* se indică un mediu de cultură deosebit faţă de celelalte. De asemenea, pentru *B. licheniformis* s-a găsit că 3 vitamine şi 7 aminoacizi sunt necesari pentru producerea α-amilazei în condiţii optime. Biosinteza de enzime a unei tulpini variază mult în funcţie de mediul utilizat. De exemplu, o tulpină de *B. subtilis* produce mai multă protează decât α-amilază, dacă este cultivată pe un mediu cu făină de peşte sau şrot de soia. Dacă se foloseşte un mediu pe bază de amidon, atunci este indusă biosinteza α-amilazei. Dacă în mediu este prezentă glucoza, aceasta are un efect puternic represor, inhibând parţial sau total biosinteza α-amilazei.

În biosinteza amilazelor şi protează lor un rol important îl au ionii de calciu şi amoniu, datorită implicării lor în sinteza acidului dipicolinic, intermediar în biosinteza acestor enzime. Ionii de calciu au, de asemenea, un rol important în stabilizarea enzimelor.

În ceea ce priveşte temperatura de cultivare, aceasta variază de la o specie la alta, fiind în general cuprinsă între 30 şi 37°C pentru *B. subtilis* şi între 50 şi 65°C pentru *B. coagulans* şi *B. stearothermophilus* (tabelul 13.4).

Pentru toate tulpinile producătoare de amilaze (tabelul 13.4), *p*H-ul optim variază între 6,0 şi 7,5. Acesta poate fi controlat şi menţinut constant pe toată durata biosintezei. Prezenţa proteinelor în mediu îmbunătăţeşte capacitatea de tamponare a mediului şi *p*H-ul se menţine relativ constant.

Biosinteza α-amilazei este un proces intens aerob, iar oxigenul insuflat o dată cu aerul sterilizat nu poate fi utilizat direct în fază gazoasă, ci numai ca oxigen dizolvat. Necesarul de oxigen solvit depinde de microorganism şi mai ales de faza

de dezvoltare în care se află acesta, intensitatea maximă de respirație situându-se în timpul fazei logaritmice. Cantitatea de oxigen este cu atât mai mare cu cât durata de generație este mai mică (fig. 13.6).

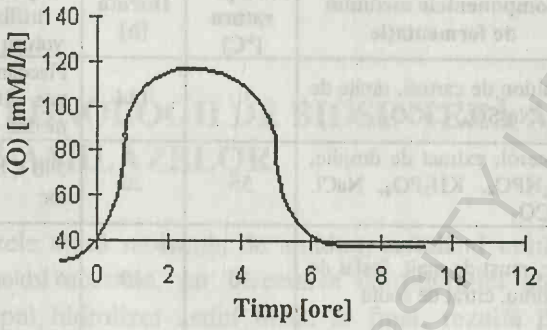


Fig. 13.6. Variația concentrației de O_2 dizolvat pe parcursul biosintezei.

Din acest motiv, biorectoarele sunt echipate cu sisteme de agitare eficiente pentru a asigura un transfer de masă al oxigenului cât mai bun. Aerul sterilizat în prealabil se insuflă sub o ușoară presiune pentru prevenirea contaminărilor.

Pentru biosinteza α-amilazei necesarul de aer este:

120 mM/l/h = 0,0224 l/l/h = 1,44 l/l/h

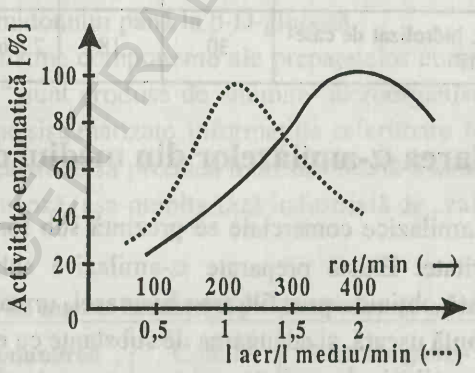


Fig. 13.7. Influența agitării și a debitului de aer asupra biosintezei α-amilazei cu *B. subtilis*.

Proprietățile fizico-chimice ale mediului de cultură, care influențează biosinteza α-amilazelor, sunt: vâscozitatea, tendința de spumare. Vâscozitatea influențează consumul de energie necesar agitării. Creșterea vâscozității mediului de cultură are ca efect scăderea transferului de oxigen și diminuarea biosintezei de α-amilază.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.4

Compoziția mediului de fermentație și condițiile de cultivare ale câtorva bacterii producătoare de α-amilază

Specia	Componentele mediului de fermentație	Temperatura [°C]	Durata [h]	Aparatura utilizată, volum mediu	După
Bacillus licheniformis	Amidon de cartofi, tărâțe de orz, Na_2SO_4, $CaCO_3$	30	144	Flacoane agitate, 100ml mediu	Outtrup, 1972
B. coagulans	Glicerol, extract de drojdie, Na_2HPO_4, KH_2PO_4, NaCl, $CaCO_3$	55	20	500 l, bioreactor	Smalley, 1972
B. subtilis	Orz, must de malț, fosfat de amoniu, citrat de sodiu	30	40	6 l, bioreactor	Markkanen and Bailey, 1974
B. stearothermophilus	Amidon de porumb, peptonă, extract de porumb, săruri	55...65	40–72	flacoane agitate, 50 ml	CPC, Internati o-nal Inc. 1979
B. licheniformis	Amidon, peptonă, săruri, aminoacizi, vitamine	48	24	flacoane agitate, 30 l, bioreactor	Chandra, 1980
B. subtilis	Amidon, extract de porumb, sulfat de amoniu, fosfat de potasiu	30	18	2 l, bioreactor	Baig, 1984
B. subtilis	Amidon, hidrolizat de cazeină, săruri	30	18	2 l, bioreactor	Pazlarova, 1984

13.2.2. Izolarea α-amilazelor din mediul de biosinteză

Preparatele α-amilazice comerciale se prezintă sub formă condiționată cu grade diferite de puritate. Există preparate α-amilazice sub formă de soluție concentrată și stabilizată obținute prin filtrarea biomasei, urmată de o concentrare până la cca 50% substanță uscată, și adăugarea de substanțe cu efect stabilizant.

Un preparat α-amilazic de puritate mai mare se poate obține astfel: lichidul perfect limpede obținut în urma filtrării este supus operației de concentrare până la 1/5 din volum și enzima este precipitată cu acetonă în proporție de 50%. Preparatul obținut se spală cu acetonă rece și se usucă corespunzător. În industrie, pentru hidroliza amidonului se utilizează preparate α-amilazice parțial purificate obținute în modul arătat anterior.

Preparatele de α-amilază destinate folosirii în zootehnie se obțin prin atomizarea integrală a mediului de cultură, deci conțin și ingredientele din acesta, rămase nemetabolizate.

În vederea obținerii unor preparate enzimatice de înaltă puritate se aplică metode specifice de purificare a enzimelor (cromatografie cu schimbători de ioni, cromatografie de afinitate etc.).

13.3. TEHNOLOGII DE BIOSINTEZĂ A β-AMILAZELOR

β-Amilazele atacă molecula de amidon, scindând unități de maltoză din capătul reducător al acesteia, cu inversarea configurației atomului de carbon anomeric în timpul hidrolizei astfel încât, în final, rezultă β-maltoză. În mod tradițional, aceste enzime sunt extrase din orz sau din malțul de orz și se găsesc și în alte semințe, cum ar fi soia. β-Amilazele de origine microbiană au devenit comerciabile abia în ultimul timp.

De obicei, β-amilaza (E.C.3.2.1.2), cu denumirea ei științifică α-1,4-gluconmaltohidrolaza, este produsă de către microorganisme, alături de α-1,6-glucozidaze (E.C.3.2.1.4.1 sau E.C.3.2.1.6.8) și de amiloglucozidază (E.C.3.2.1.3). Preparatele enzimatice parțial purificate conțin și aceste enzime, astfel explicându-se faptul că sunt atacate și legăturile α-1,6 din amilopectină, iar în final are loc hidroliza totală a amidonului până la β-D-glucoză.

Cele trei enzime componente ale preparatelor comerciale denumite „enzime de zaharificare" sunt produse de anumite microorganisme în diferite cantități. În tabelul 13.5 sunt sistematizate informațiile referitoare la producerea celor trei tipuri de amilaze, capabile să producă hidroliza totală a amidonului lichefiat (cu α-amilază) până la glucoză (așa-numita fază industrială de „zaharificare").

Tabelul 13.5

Microorganisme de interes industrial producătoare de „enzime de zaharificare"

Denumirea comercială a enzimei	Denumirea sistematică	Codul enzimei	Microorganismul producător	După
1	2	3	4	5
β-Amilază	α-1,4-Glucon maltohidrolază	E.C. 3.2.1.2.	*Bacillus polymyxa*	Robyt and French (1964) Griffin and Fogarty (1973)
			Bacillus circulans	Napier (1977)
			Bacillus megaterium	Higashihara and Osada (1974)
			Bacillus cereus var. mycoides	Takasaki (1976)

Tabelul 13.5 (continuare)

1	2	3	4	5
Amylogluco zidază (glu-coamilază)	α-1,4-Glucon glucohidrolază	E.C. 3.2.1.3.	*Aspergillus niger*	Aunstrup (1967) Lasater, Smith (1979) Svensson (1982)
			Aspergillus awa-mori	Flor and Hayashida (1983)(24)
			Clostridium ther-moamylolyticum	Katkocin ş.a. (1985)
			Halobacterium sodomense	Oren (1983)
Glucozida-zele	α-1,6-Glucozi-daze	E.C. 3.2.1.4.1 E.C. 3.2.1.6.8	*Aerobacter (Klebsiella) aerogenes*	Bulich (1978) Takizawa and Mu-rooka (1985)
			Bacillus acido-pullulyticus	Nielsen (1982)(30)
			Pseudomonas	Harada (1968)
			Bacillus stearo-thermophilus	Suzuki and Imai (1985)

13.3.1. Tulpini modificate genetic, producătoare de β-amilaze

Selecția de tulpini producătoare de β-amilaze a constituit o preocupare permanentă în domeniu. Gena β-amilazei din *B. cereus* a fost clonată în *Escherichia coli*, utilizând un vector plasmidial, dar tulpina gazdă a produs un nivel scăzut în enzimă [Colson, 1981]. În anul 1984, Outtrup şi Norman au descoperit o amilază maltogenică termostabilă într-o tulpină de *Bacillus stearothermophilus*. Tulpina parentală era dificil de cultivat în scopul producției de enzimă.

Utilizând tehnica ADN-recombinant s-a introdus gena amilazei într-o plasmidă potrivită pentru clonări în *B. subtilis*, utilizând *Escherichia coli* ca o gazdă intermediară. Astfel s-a obținut o tulpină de *B. subtilis* transformată, care a fost cultivată la flacoane agitate la 30°C, utilizând un mediu pe bază de amidon, făină de soia, fosfat de sodiu şi a biosintetizat de 10–20 ori mai multă amilază decât tulpina parentală de *B. stearothermophilus* cultivată pe un mediu puțin diferit la 50°C [Outtrup şi colab., 1984]. Producția tulpinii transformate a fost de 200 EU/ml mediu de cultură, determinată la 50°C, *p*H = 5,5 şi are o importanță comercială deosebită. După cum se vede, enzima are avantajul că acționează la o temperatură mai ridicată decât celelalte enzime de zaharificare conținute în alte produse comerciale.

13.3.2. Amiloglucozidaze

Amiloglucozidaza (glucoamilaza) atacă extremităţile nereducătoare ale amidonului şi pune în libertate β-glucoză. Ea atacă, de asemenea, încet, legăturile α-1,6- din amilopectină, astfel încât se poate obţine cantitativ glucoză, din soluţii diluate de amidon. Această enzimă se utilizează împreună cu α-amilaza şi glucozizomeraza, la obţinerea siropului de glucoză şi fructoză din amidon. Se utilizează, de asemenea, în industria berii pentru mărirea fermentabilităţii materiilor prime vegetale. Alături de proteazele pentru detergenţi, amiloglucozidazele sunt enzime de mare tonaj. Ele sunt produse în fermentatoare mari de aproximativ 100 m^3 capacitate şi cantităţile de ordinul a zeci de mii de tone de soluţie concentrată conţin numai câteva procente de enzimă-proteină activă. Câteva milioane de tone de amidon sunt prelucrate anual cu ajutorul acestor enzime [Norman, 1981].

Mediile de cultură pentru aceste enzime conţin, în general, 5–20% făină de porumb, iar uneori se suplimentează cu amidon de porumb sau extract de porumb. Un astfel de mediu poate să nu mai conţină alte ingrediente. *p*H-ul se menţine la valoarea 5,5 cu soluţie de NH_3 sau NaOH. Dworschack şi Nelson au demonstrat că producţia în amiloglucozidaze creşte cu 60%, dacă se adaugă săruri de amoniu la începutul fermentaţiei şi apoi se corectează *p*H-ul la valoarea 4 cu NaOH [Dworschack şi Nelson, 1972].

13.4. HIDROLIZA ENZIMATICĂ A AMIDONULUI UTILIZÂND PREPARATE AMILOLITICE DE ORIGINE MICROBIANĂ

Studiul dinamicii hidrolizei amidonului de către sistemele enzimatice amilolitice produse de diferite microorganisme a demonstrat că procesul depinde de raportul diferitelor amilaze şi glucoamilaze, precum şi de activitatea oligozaharidazelor. Din acest motiv, fiecare producător de enzime stabileşte pentru hidroliza enzimatică a amidonului anumite condiţii de lucru în funcţie de compoziţia preparatului enzimatic amilolitic folosit şi de scopul urmărit.

Hidroliza amidonului cu ajutorul acizilor şi enzimelor este cunoscută încă de la începutul secolului al XIX-lea. Transformarea amidonului în glucoză prin procedeele curente cuprinde două faze distincte (indiferent de procedeul aplicat): *solubilizarea* (transformarea amidonului într-o formă solubilă) şi *hidroliza propriu-zisă* (în care procesul de degradare decurge până la molecula de glucoză).

Din punct de vedere al agentului de acţiune, procedeele de hidroliză se pot clasifica în:

– procedeul acid, în cele două faze utilizându-se acizi minerali;

– procedeul acid-enzimă: solubilizarea, lichefierea amidonului se fac cu acid, iar zaharificarea cu enzime β-amilazice;

– procedeul enzimă-enzimă: lichefierea suspensiei de amidon se face cu α-amilază, iar zaharificarea cu preparate β-amilazice.

Lichefierea şi zaharificarea enzimatică dau practic conversii cantitative ale amidonului la glucoză, dacă sunt aplicate consecutiv.

Lichefierea acidă şi zaharificarea enzimatică dau randamente de glucoză cu 5% mai mici decât sistemul enzimă-enzimă, iar procedeul acid cu 12% mai mici decât în procedeul dublu enzimatic.

Dezavantajele hidrolizei acide sunt următoarele:

– obţinerea unui grad de puritate mic al hidrolizatului din cauza produşilor reversibili: hidroximetilfurfurol, acid levulic, acid formic;

– randament diminuat al hidrolizei din cauza produşilor secundari rezultaţi;

– apariţia unor procese de coroziune a instalaţiilor în care se desfăşoară procesul enzimatic.

Procedeele enzimatice se utilizează în prezent la fabricarea hidrolizatelor de amidon pentru obţinerea unor sortimente cu diverse proporţii între principalele componente: glucoză, fructoză, maltoză, dextrine.

Pentru efectuarea tratamentelor enzimatice s-au izolat microorganisme şi se produc – aşa cum s-a arătat – enzime specifice pentru fiecare din cele două faze şi anume: α-amilaza bacteriană termostabilă pentru procesul de solubilizare-dextrinizare şi β–amilaze pentru zaharificarea propriu-zisă.

În funcţie de scopul urmărit, suspensia de amidon supusă hidrolizei poate avea o concentraţie de 30–40% substanţă uscată (dacă soluţia obţinută se foloseşte la extracţia şi purificarea glucozei) sau 10–20% substanţă uscată (dacă soluţia obţinută se foloseşte la prepararea unor medii de fermentaţie, de exemplu în fermentaţia lactică sau fermentaţia alcoolică).

13.4.1. Parametrii de control ai hidrolizei enzimatice

Pentru studiul reacţiei de hidroliză enzimatică a amidonului este necesară definirea următorilor parametri:

– *S* – concentraţia substratului, exprimată în % amidon; conţinutul în amidon al materiei prime se determină o singură dată, la începutul experimentărilor, toate lucrările ulterioare fiind efectuate pe aceleaşi loturi de materii prime;

– *E/S* – concentraţia enzimei; raportarea cantităţii de enzimă la substratul utilizat este un parametru care trebuie specificat şi calculat pentru orice curbă

enzimatică, acesta fiind elementul esențial de determinare a timpului de hidroliză, astfel încât să se atingă gradul de hidroliză dorit.

– T – temperatura reacției enzimatice este parametrul esențial, care se menține și se indică de fiecare dată;

– pH – determinarea pH-ului în mediul de reacție se efectuează inițial cât și pe parcurs;

– GH – gradul de hidroliză este definit ca raportul între cantitatea de amidon transformată în glucide reducătoare și cantitatea totală de amidon supusă hidrolizei:

$$GH = \frac{g}{g_{tot}} \cdot 100\%,$$

unde: g este conținutul în glucide reducătoare ale mediului de hidroliză; g_{tot} – conținutul în amidon al suspensiei de materie primă (făină de porumb, cartofi) supusă hidrolizei enzimatice.

Pentru un sistem dat se pot aproxima următoarele interdependențe între valorile raportului E/S și gradul de hidroliză:

– pentru un raport dat E/S timpul de atingere al unui anumit grad de hidroliză este independent de concentrația substratului;

– timpul de hidroliză până la un anumit grad este invers proporțional cu raportul E/S;

– timpul de hidroliză este direct proporțional cu activitatea enzimei.

Din acest motiv, la toate curbele trasate se specifică raportul E/S. Se menționează că acesta este diferit de concentrația enzimei în mediul de hidroliză, specificată de asemenea în experiențele respective.

13.4.2. Compoziția mediului de hidroliză

Pentru exemplificare, se prezintă în continuare modul de stabilire a condițiilor optime de hidroliză a amidonului din porumb, în scopul obținerii unei soluții de glucoză utilizabilă în fermentația lactică sau în cea alcoolică.

Pentru fermentația lactică este necesară obținerea unor soluții de glucoză și maltoză de concentrații cuprinse între 10–12%, astfel încât pentru hidroliză se porneşte de la medii conținând circa 10–12% amidon. Soluțiile care au concentrații sub 10% sunt considerate neeficiente pentru fermentația lactică la faza de regim, dar sunt indicate pentru faza de inocul de laborator și inocul industrial, când pentru dezvoltarea rapidă și abundentă a unei culturi se recomandă soluții de 5–7% glucide reducătoare.

De fapt s-a constatat că în condiții de laborator, unde fenomenul evaporării este mai intens și mai greu de stăpânit, la concentrații mai mari de amidon se produce fenomenul de gonflare a pastei de amidon, ceea ce împiedică desfășurarea

în bune condiţii a operaţiei de hidroliză enzimatică; în cazul hidrolizei acid-enzimă, proporţia de amidon în mediu poate fi mărită până la 40%. Experienţele de hidroliză enzimatică efectuate cu soluţii de amidon cu diferite concentraţii (experimentele s-au realizat în cadrul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice Bucureşti) au stabilit raportul optim între cantitatea de materie primă (uruială de porumb sau de mălai superior) şi de apă pentru hidroliza enzimatică după cum urmează:

- varianta I: 50 g uruială de porumb; 200 ml apă distilată;
- varianta a II-a: 50 g mălai superior; 300 ml apă distilată.

S-a constatat că la raporturi mici între făina de porumb şi apă se produce adsorbţia apei de către granulele de amidon (gonflare) şi apariţia produselor de hidroliză este îngreunată. De asemenea, acest raport diferă în funcţie de gradul de măcinare a făinii de porumb şi de conţinutul în amidon. Pentru mălaiul superior este necesar un raport de 1:6 faţă de uruială, unde este suficient 1:4. La diluţii prea mari, păstrând acelaşi raport *E/S*, concentraţia enzimelor în soluţie devine insuficientă şi randamentul de hidroliză este mai mic.

Întrucât în compoziţia mediului de cultură utilizat în fermentaţia lactică este necesară şi adăugarea de săruri (sulfat de amoniu, fosfat diamoniacal, carbonat de calciu), pentru a evita sterilizarea separată a acestora s-a încercat efectuarea reacţiei de hidroliză enzimatică a făinii de porumb (uruială sau mălai superior) în prezenţa sărurilor respective. Rezultatele obţinute au demonstrat că reacţia enzimatică nu este afectată de prezenţa sărurilor (în concentraţiile respective), astfel încât adăugarea acestora se poate efectua chiar în faza de hidroliză.

Studii recente ale procesului de hidroliză a amidonului cu preparate α-amilazice microbiene au arătat că activitatea catalitică a enzimei scade exponenţial când concentraţia glucozei rezultate creşte peste 40% (fig. 13.8 şi 13.9).

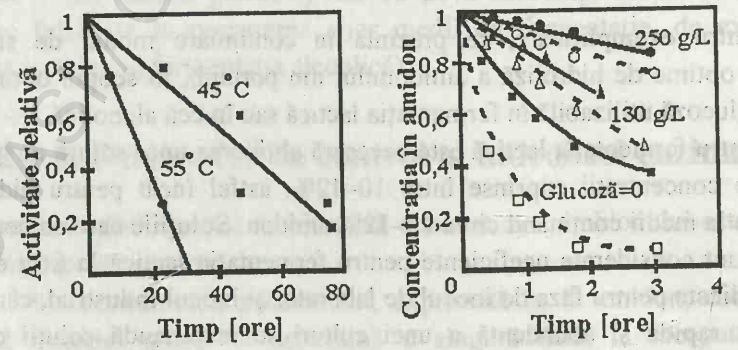


Fig. 13.8. Cinetica hidrolizei amidonului de grâu cu α-amilază bacteriană (□Δo) şi α-amilază din orz (■▲•): 8 g/l enzimă şi concentraţia relativă a amidonului raportată la concentraţia iniţială 30 g/l.

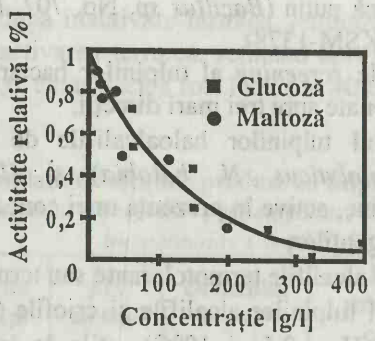


Fig. 13.9. Efectul de inhibiție exponențială a glucidelor asupra activității α-amilazei.

În figura 13.8 sunt arătate experiențe de hidroliză a amidonului, efectuate cu diferite concentrații inițiale și două enzime de proveniență diferită: α-amilază bacteriană și extrasă din malț. Evoluția procesului de hidroliză s-a urmărit prin determinarea concentrației în glucoză, rezultate în urma reacției. Se observă o scădere exponențială a concentrației în glucoză chiar de la timpul zero. Din figura 13.9 se observă că ambele glucide – glucoza și maltoza – au efect de inhibiție similar asupra procesului de hidroliză.

13.5. ENZIME AMILOLITICE ACTIVE ÎN DOMENIUL DE *p*H ALCALIN

13.5.1. Microorganisme producătoare

Amilazele au fost intens studiate și caracterizate, în special enzimele active la *p*H acid si neutru. Primul cercetător care a detectat o amilază alcalină (activă la *p*H > 8) a fost Koki Horikoshi, în anul 1971.

Ulterior au fost evidențiate și descrise numeroase tulpini bacteriene alcalifile Gram-pozitive bune producătoare de amilaze alcaline (în special cele din genul *Bacillus sp.*), în timp ce doar câteva bacterii Gram-negative cu proprietăți amilolitice au fost raportate până în prezent în literatură. În plus, nu a fost descrisă nici o tulpină neutrofilă producătoare de enzime ce degradează amidonul active în domeniul de *p*H alcalin.

Unele tulpini alcalifile de *Bacillus sp.* sunt de tip zaharogen (de exemplu: *Bacillus sp.* NRRL B-3881, *Bacillus sp.* H-167, *Bacillus alcalothermophilus* A 3-8, *Bacillus sp.* GM 8901) și produc enzime care dextrinizează mai întâi amidonul și apoi îl zaharifică. Doar puține tulpini de *Bacillus sp.* cunoscute sunt de tip dextrinogen, adică produc amilaze de lichefiere (α-amilaze) care dextrinizează

rapid amidonul şi îl zaharifică puţin (*Bacillus sp.* No. 707, *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13 şi *Bacillus sp.* KSM-1378).

În prezent studiile de *screening* al tulpinilor bacteriene producătoare de amilaze alcaline sunt direcţionate spre trei mari direcţii:

– izolarea şi studiul tulpinilor haloalcalifile de *Natrobacterium sp.*, *Natrococcus sp.* (*N. amylolyticus, N. halobia*) şi *Halomonas sp.*, care biosintetizează amilaze alcaline, active în prezenţa unei concentraţii mari de săruri, foarte utile în industria detergenţilor;

– izolarea tulpinilor alcalifile termotolerante sau termofile;

– izolarea şi studiul tulpinilor alcalifile şi criofile (*Micrococcus sp.* 207 produce amilaze active la *p*H = 9,5 şi 10°C), utile în industria detergenţilor, alimentară şi biodegradare.

13.5.2. Proprietăţile enzimelor alcaline care degradează amidonul

Tulpinile microbiene alcalifile produc numeroase şi variate enzime care degradează amidonul şi care sunt active la *p*H alcalin: amilaze, α-glucozidaze, ciclomaltodextrin-glucotransferaze-CGT-aze, pullulanaze, amilopullulanaze-AP-aze etc.

Amilazele alcaline produse de tulpini alcalifile de *Bacillus sp.* au fost clasificate în funcţie de *p*H de activitate în patru tipuri:

– tipul I, amilaze ce prezintă un singur *peak* al activităţii enzimatice la *p*H = 10,5;

– tipul II, enzime amilolitice ce prezintă două *peak*-uri la valorile de *p*H = (4,0–4,5) şi respectiv 9,0–10,0;

– tipul III, enzime amilolitice care prezintă trei *peak*-uri la *p*H de 4,5; 7 şi respectiv 9,5–10,0;

– tipul IV, amilaze active la *p*H = 4,0, dar care prezintă o uşoară mărire a activităţii enzimatice la *p*H = 10,0.

Prezenţa mai multor *peak*-uri în curba ce reprezintă grafic efectul *p*H asupra activităţii amilolitice sugerează faptul că se sintetizează mai multe componente ale enzimei, dar studiile de clonare a genelor amilazei au arătat că o singură enzimă (nu o mixtură) poate prezenta trei *peak*-uri ale activităţii enzimatice.

Caracteristicile şi proprietăţile celor patru tipuri de amilaze alcaline produse cu tulpini de *Bacillus sp.* au fost prezentate în studiile comparative realizate de Yamamoto şi colab. Dintre cele patru tipuri de enzime doar amilazele de tipul I sunt complet absorbite de DEAE-celuloză la *p*H = 9,0. Aceste enzime se dovedesc a fi şi cele mai termolabile în urma încălzirii la 55°C, timp de 15 minute, în prezenţă de 10 mM Ca^{2+} (ionii de calciu au efect protector pentru amilazele supuse tratamentelor termice, dar acest efect diferă de la o enzimă la alta). Tipul II şi tipul IV de enzime sunt relativ mai stabile decât tipul I, ele pierd 70–90 % din

activitatea originală după inactivare termică. Amilaza de tip III se dovedeşte a fi cea mai stabilă la inactivarea termică, reţinând aproximativ 50% din activitate la *p*H = 4,5 ori *p*H = 10,0, chiar dacă a fost încălzită 40 minute la 65°C (tabelul 13.6).

Tabelul 13.6

Proprietăţile amilazelor alcaline produse cu tulpini alcalifile de *Bacillus sp.*
(după K. Horikoshi - *Enzymes of alkalophiles*, in *Microbial enzymes and biotechnology*, pp. 275-294)

Tipul de amilaza	Tulpina de *Bacillus sp.*	*p*H optim	Domeniul de *p*H*	Efectul protector al calciului	Produşii hidrolizei
I	A-40-2	10,5	7,0–9,5	+	glucoză şi maltooligozaharide
	A-59	10,5	7,0–9,5	+	
	27-1	10,5	7,0–9,0	+	
	124-1	10,5	7,0–9,0	+	
II	135	4,0; 10,0	7,0–9,0	+	ciclodextrine β>α
	169	4,0; 10,0	7,0–9,0	+	
III	38-2	4,5; 9,0	5,0–10,5	+	α:β:γ=1:15:4
IV	17-1	4,5	6,5–10,0	+	α:β:γ=1:45:15
	13	4,5	6,5–10,0	+	

*domeniul de *p*H unde 50% din activitate rămâne după incubare la 50°C, timp de 15 minute; α: α-ciclodextrine, β: β-ciclodextrine, γ: γ-ciclodextrine;
+: pozitiv

Enzimele produse de tulpinile de *Bacillus sp.* 38-2, 17-1 şi 13 au o intensă activitate CGT-azică, catalizând descompunerea amidonului la ciclodextrine (compuşi formaţi din 6 sau 8 unităţi de glucoză legate prin legături α-1,4). Există trei tipuri de ciclodextrine: α, β şi γ.

Tulpina A-40-2 (ATCC 21592) a fost selectată din 300 de colonii bacteriene crescute pe mediul Horikoshi II, ce conţine amidon 1%, polipeptonă 1%, săruri minerale şi are *p*H = 10,0. Enzima produsă de această bacterie este o α-amilază ce hidrolizează 70% din amidon producând glucoză, maltoză şi maltotrioză. Amilaza este activă la *p*H = (10–10,5) şi păstrează 50% din activitate la *p*H de 9,0 şi 11,5, dar este inhibată de 10 mM EDTA la 30°C şi este complet inhibată de uree.

Enzima (amilaza de tip I) sintetizată de *Bacillus sp.* A-59 (ATCC 21591) a fost separată în două fracţii:

a) prima fracţie are greutatea moleculară relativă de 50 000;
b) a doua fracţie are greutatea moleculară de 70 000.

Raportul între cele două fracţii este de 10/1, iar alte diferenţe semnificative între enzime nu au fost observate. La această tulpină bacteriană au fost identificate trei enzime alcaline care degradează amidonul: α-amilaza, α-glucozidaza şi pullulanaza. Activitatea α-amilazică maximă (30 U/ml) a fost obţinută după 24 de

ore de cultivare submersă, dar este mult redusă față de activitatea α-glucozidazică (270 U/ml).

Tulpina bacteriana alcalifilă *Bacillus sp.* NCIB 11203, care a fost izolată din sol, s-a dovedit a fi bună producătoare nu doar de amilaze, ci și de proteaze, α-glucozidaze și fosfataze alcaline. Enzimele au fost purificate prin fracționare cu sulfat de amoniu și cromatografie pe DEAE-Biogel și sunt active la *p*H neutru.

În anul 1994 o nouă amilază extracelulară a fost purificată de la alcalifilul *Bacillus sp.* IMD 370. Enzima este activă la *p*H = 10,0; 40°C, are *p*I = 4,9 și greutate moleculară de 159 000 (estimată pe gel de SDS-poliacrilamidă). Amilaza diferă prin mecanismul de acțiune față de toate enzimele cunoscute, modul ei de acțiune fiind un hibrid între tipul endo-, o α-amilază și o enzimă tipică cu mecanism exo- (ca de exemplu amiloglucozidaza). Enzima hidrolizează amidonul producând glucide cu conformația α (în special maltooligozaharide), motiv pentru care acest tip de amilază alcalină este foarte utilă în industria detergenților. În plus, această amilaza este prima enzima descrisă care poate ataca amidonul din carne vie, pe care îl degradează la glucoză, maltoză, maltotrioză și maltotetroză. Activitatea optimă pentru hidroliza amidonului din carne vie s-a înregistrat la *p*H = 8,0, în timp ce pentru hidroliza amidonului solubil a fost stabilită la *p*H = 10,0. Degradarea amidonului din carne vie a fost stimulată de 6 ori de prezența β-ciclodextrinei (17,5 mM).

Cercetări amănunțite au fost realizate asupra α-amilazei de lichefiere, activă la *p*H alcalin, numită LAMY și produsă de alcalifilul *Bacillus sp.* KSM-1378. Enzima are activitate maximă la *p*H = (8.0–8.5) și 55°C, are greutatea moleculară pe SDS de aproximativ 53 kDa, iar punctul izoelectric la *p*H = 9,0. Aceasta amilază alcalină hidrolizează eficient amidonul la maltotrioză, maltopentoză, maltohexoză și maltoză (produs majoritar), deci este o amilază de lichefiere. Studiile de cristalografie realizate au evidențiat faptul că structura terțiară a enzimei prezintă trei domenii (notate A, B și C) și structuri de tip $(\alpha/\beta)_8$ în domeniul A. LAMY este complet inhibată de concentrații scăzute de N-bromosuccinat (0,1 mM), care oxidează resturile de triptofan; reziduuri implicate în legarea substratului și/sau în situsul catalitic activ la amilaze. Îmbunătățirea termostabilității la enzima LAMY s-a realizat prin studii de mutageneză situs-specifică, care au permis îndepărtarea reziduului arginina 181-glicina 182. Îndepărtarea acestui reziduu, care este reprezentat de o secvență de aminoacizi înalt conservată (observată la mai multe amilaze, la BAA – produsă de *B. amyloliquefaciens*, la BSA – sintetizată de *B. stearothermophilus*, la BLA – produsă de *B. licheniformis*) a permis o îmbunătățire a legării calciului și o creștere a hidrofobicității enzimei.

Dintre bacteriile Gram negative a fost intens studiată o tulpină alcalitolerantă de *Pseudomonas sp.*, producătoare de amilaze și izoamilaze active la *p*H alcalin. Studii genetice realizate asupra operonului amy de la *Pseudomonas sp.* și de la tulpinile alcalifile de *Bacillus sp.* dovedesc existența unor zone înalt conservate la nivelul acestor gene.

Altă bacterie alcalitolerantă intens studiată din punct de vedere biochimic şi genetic este tulpina de *Micrococcus* sp. Y-1, ce creşte în medii cu *p*H = (6–12) şi secretă amilaze şi pullulanaze active la *p*H alcalin. Cercetările au fost realizate în cadrul proiectului japonez Horikoshi Superbugs Project şi au urmărit estimarea mărimii genomului bacterian (care conţine 4061 kb, din care 70% baze G+C) şi realizarea unei hărţi genomice fizice folosind electroforeza în câmp pulsant. Tot în cadrul acestui proiect s-a reuşit clonarea genei pentru amilaza G 6 de la bacteria alcalifilă *Bacillus sp.* H-167 într-o tulpină de *E. coli* utilizând vectorul de clonare pBR 329 şi dezvoltarea unui sistem de vectori gazdă (pC 194, pHW 1) purtători ai genelor pentru α-amilaza de la *Bacillus sp.* A-59.

Puţine informaţii sunt cunoscute despre amilazele produse de tulpinile bacteriene haloalcalifile din genurile *Natrobacterium sp.* şi *Natrococcus sp.* (*N. amylolyticus*). Aceste specii, izolate din medii hipersaline şi alcaline sunt membrii alcalifili ai familiei *Halobacteriaceae* şi formează un grup fiziologic distinct deoarece necesită pentru creştere concentraţii mari de NaCl, Mg^{2+} şi *p*H alcalin. Amilaza purificată de la *Natrococcus halobia* a fost stabilă într-un domeniu larg de *p*H (6,0–10,0), cu optimum la *p*H = 7,0, în prezenţă de 0,25M NaCl sau 0,75 M KCl, la 55...55 °C. Enzima degradează amidonul la maltoză, maltotrioză, maltotetroză şi o cantitate mică de glucoză.

13.5.3. Tehnologia de biosinteză a amilazelor alcaline

În biosinteza amilazelor alcaline importanţă deosebită o are atât selecţia tulpinilor cu potenţial ridicat, cât şi optimizarea formulei mediului nutritiv şi a parametrilor de cultivare.

Efectul *p*H-ului iniţial asupra activităţii enzimatice. Studiile realizate au evidenţiat faptul că păstrarea mediului de cultură la valori alcaline de *p*H are un rol foarte important în biosinteza amilazelor alcaline. Acest lucru se realizează prin adăugarea în mediu a carbonatului sau bicarbonatului de sodiu, astfel încât să se asigure în mod constant un *p*H mai mare de 8 în timpul cultivării microorganismului alcalifil. În plus, este cunoscut faptul că sinteza maximă de enzime microbiene extracelulare se obţine la un *p*H al mediului apropiat de *p*H optim de activitate a enzimei.

Cercetările efectuate la tulpinile alcalifile: *Bacillus alcalophilus* subsp. *halodurans* (ATCC 21591), *Bacillus sp.* NCIB 11203 şi *Bacillus sp.* IMD 370 au evidenţiat efectul *p*H iniţial asupra biosintezei amilazelor alcaline. Când cele trei tulpini microbiene au fost crescute la valori neutre şi slab alcaline de *p*H, cantitatea de biomasă şi producţia de amilaze a fost foarte scăzută. Cantitatea maxima de α-amilază a fost obţinută după 24 ore de cultivare, în mediu de cultură cu *p*H iniţial = (10–10,5) (tabelul 13.7).

Tabelul 13.7

Efectul *p*H inițial asupra activității enzimatice și a acumulării de biomasă la tulpina *Bacillus sp.* ATCC 21591

(după C. T. Kelly et al. - *FEMS Microbiology Letters*, 20, (1983), pp. 55-59)

*p*H inițial	*p*H (15 h)	*p*H (24 h)	Biomasa (D.O. 650 nm)		Activitatea α-amilazică (U/ml)	
			15 h	24 h	15 h	24 h
6,5	6,5	6,5	0	0	0	0
7,35	7,35	7,35	2	2	0	0
9,0	6,3	6,1	56	20	14	18
9,7	6,6	6,5	88	30	26	28
10,2	8,7	8,6	130	200	30	44
10,4	9,4	9,2	200	280	33	46

În plus, la alcalifilul *Bacillus sp.* IMD 370 s-a remarcat o scădere a *p*H-ului în mediul de cultură de la 10,0 (*p*H inițial) la 8,5 (la 18 ore de cultivare), urmată de o ușoară creștere până la valoarea finală 9,2. Și la tulpina alcalifilă *Bacillus sp.* ATTC 21591 s-a observat o scădere puternică a *p*H-ului în mediul de cultură, de la 9,7 (*p*H inițial) la 6,4–6,5 (după 24 ore de cultivare). Această evoluție a *p*H din mediu spre valori slab acide este surprinzătoare pentru un microorganism alcalifil, care prezintă o creștere foarte slabă la valori neutre de *p*H. Scăderea *p*H-ului în mediul de cultură a fost asociată cu o scădere bruscă a biomasei și a producerii de α-amilază și pullulanază, dar nu a influențat producerea α-glucozidazei. În schimb, păstrarea constanta a *p*H în mediul de cultură la valoarea 9,7, timp de 48 de ore, a determinat o mărire considerabilă a cantității de biomasă microbiană și a sintezei de α-amilază și pullulanază, fără să se producă α-glucozidază.

Efectul inoculului asupra activității enzimatice. Cantitatea și calitatea inoculului este un alt factor important care asigură mărirea randamentului de biosinteza al amilazelor alcaline. Excesul de microorganisme în inocul determină aglomerarea celulelor și consumul rapid al surselor de carbon și de azot, în timp ce o cantitate mică de inocul scade randamentul de producere a enzimei și prelungește timpul de cultivare (fig. 13.10).

La tulpinile alcalifile *Bacillus alcalophilus* subsp. *halodurans* (ATCC 21591), *Bacillus sp.* NCIB 11203, *Bacillus sp.* IMD 370 s-a studiat efectul cantității și calității inoculului asupra activității enzimatice. Rezultate optime au fost obținute la prepararea unui inocul standard, rezultat prin cultivarea microorganismului în 50 ml mediu de întreținere (dispus în flacoane Erlenmeyer de 250 ml), până când cultura ajunge în faza logaritmică medie de creștere. Mediul de întreținere a tulpinilor bacteriene conține (g/l): 1% amidon solubil, 0,6% peptonă bacteriologică, 0,3% extract de drojdie, 0,1%, K_2HPO_4; 0,04%; $MnSO_4 \times 4\ H_2O$; 0,2% $MgCl_2 \times 6\ H_2O$; 1,5% agar și 4% Na_2CO_3, *p*H inițial = 9,7. Producerea de amilază s-a realizat pe mediu însămânțat cu 1% inocul, în condiții de agitare (200 rpm), la *p*H inițial = 10,0 și 30°C, cu un raport de aerare de 1:5.

La tulpina alcalifilă *Bacillus sp.* KSM-1378, izolată din sol, inoculul a fost obținut pe mediu de cultură complex (diferit de mediul de biosinteză al amilazei

alcaline) ce contine (g/l): 1% amidon solubil, 0,2% triptonă, 0.1% extract de drojdie, 0,2% KH_2PO_4; 0,1% $MgSO_4 \times 7\ H_2O$; 0,1% $CaCl_2 \times 2H_2O$; 0,001% $FeSO_4 \times 7H_2O$; 0,0001% $MnCl_2 \times 4H_2O$ şi 1% Na_2CO_3, 1% agar, *p*H iniţial = 10,0. Pentru producerea de enzimă microorganismul a fost cultivat timp de 48 de ore, în condiţii de agitare (125 rpm) şi aerare (1:10). Amilaza obţinută a fost purificată şi a prezentat o activitate specifică de 5000 U/mg. proteină, valoare mai mare de 5 ori decât cea realizată de tulpina *Bacillus licheniformis*, utilizată în prezent la obţinerea pe cale industrială a amilazelor alcaline, termostabile.

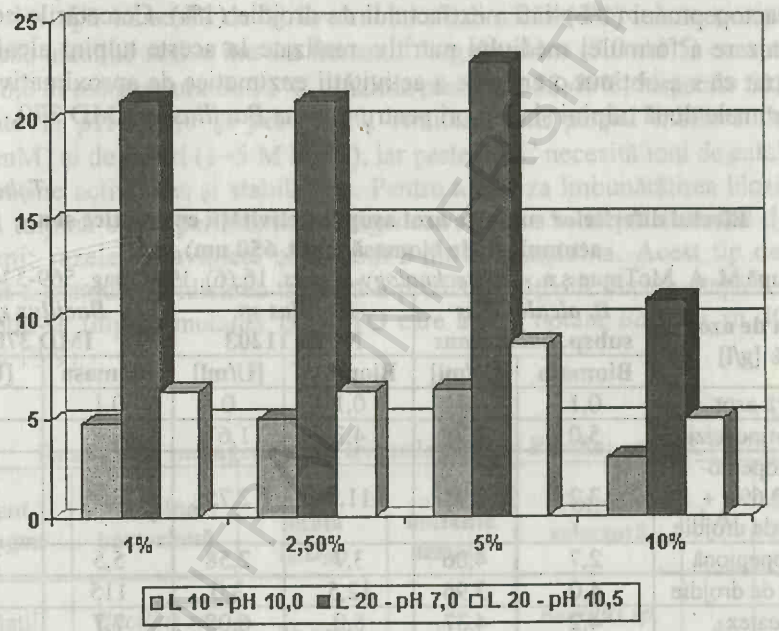


Fig. 13.10. Efectul diferitelor concentraţii de inocul (1–10%) asupra activităţii amilolitice la două tulpini alcalifile *Bacillus sp.* ICCF 276 (L 10) şi *Pseudomonas sp.* ICCF 277 (L 20).

Optimizarea mediului de cultură şi a condiţiilor de cultivare. Natura şi cantitatea surselor de carbon şi de azot în mediul de cultura sunt factori importanţi care reglează creşterea alcalifililor şi producerea de enzime amilolitice alcaline. Amidonul solubil, în raport de 1% este cea mai folosită sursă de carbon pentru dezvoltarea tulpinilor alcalifile producătoare de enzime care degradează amidonul. La toate tulpinile studiate utilizarea amidonului (în special, amidonul din cartof) a determinat mărirea cantităţii de biomasă microbiană dar şi a activităţii amilolitice.

Un rol foarte important în producerea de enzime cu ajutorul microorganismelor îl are sursa de azot, care poate fi un factor de limitare a creşterii microbiene. Cercetările realizate la tulpinile: *Bacillus alcalophilus* subsp. *halodurans, Bacillus sp.* NCIB 11203 şi *Bacillus sp.* IMD 370 au evidenţiat faptul

că un nivel scăzut de azot în mediu determină o scădere a activității enzimatice, iar excesul de azot poate duce (în unele cazuri) la o inhibare completă a producerii de amilaze alcaline (tabelul 13.8). Aceste tulpini alcalifile au fost crescute pe diferite surse de azot: casaminoacizi, bactopeptonă, extract de drojdie, sirop de porumb, extract de soia, yeatex.

Dintre diferitele surse de azot testate cea mai bună s-a dovedit a fi yeatex, care a determinat o mărire a activității amilolitice la toate cele trei tulpini microbiene. Pentru tulpina *Bacillus alcalophilus* subsp. *halodurans* o mărirea semnificativă a activității amilolitice s-a observat și în cazul folosirii ca sursă de azot a bactopeptonei (1%) sau a extractului de drojdie (1%). Cercetările complete de optimizare a formulei mediului nutritiv, realizate la aceste tulpini alcalifile au demonstrat că s-a obținut o creștere a activității enzimatice de aproximativ 3,5 ori pentru primele două tulpini și de 5 ori pentru tulpina *Bacillus* sp. IMD 370.

Tabelul 13.8

Efectul diferitelor surse de azot asupra activității enzimatice și a acumulării de biomasă (D.O. 650 nm)

(după M. A. McTigue ș.a. – *Biotechnology Letters*, 16 (6), 1994, pag. 569-574)

Sursa de azot 1% [g/l]	*B. alcaliphilus* subsp. *halodurans*		*Bacillus sp.* NCIB 11203		*Bacillus sp.* IMD 370	
	Biomasa	[U/ml]	Biomasa	[U/ml]	Biomasa	[U/ml]
Fără azot	0,1	0	0,1	0	0,1	0
Casaminoacizi	5,0	2,71	4,3	1,67	5,6	2,0
Bactopeptonă (0,6%) + extract de drojdie	3,2	2,71	11,7	2,75	8,9	2,25
Bactopeptonă	2,7	4,06	3,7	2,58	5,5	2,33
Extract de drojdie	4,0	3,96	12,5	3,0	115	2,5
Yeatex	4,2	4,37	8,0	6,08	7,7	7,68
Extract de porumb	1,8	0	9,0	3,42	10,5	2,5
Extract de soia	8,5	3,37	9,5	4,04	9,0	4,17

La majoritatea tulpinilor alcalifile s-a constatat că nu există o corelație între nivelul biomasei microbiene și activitatea enzimatică. Spre exemplu, tulpina *Bacillus sp.* IMD 370 crescută pe mediu cu extract de drojdie produce o cantitate mare de biomasă ($D.O._{650\ nm}$ = 11,5) și activitate amilazică scăzută (2,5 U/ml); iar dacă bacteria este crescută pe yeatex nivelul biomasei microbiene este scăzut ($D.O._{650nm}$ = 7,7) și activitatea enzimatică de 7,68 U/ml.

Într-o serie de cazuri pentru mărirea activității amilolitice s-au folosit ca surse de vitamine extractul de drojdie, extractul de porumb sau extractul de germeni de malț. În plus, adăugarea în mediu a sărurilor minerale, în special a ionilor de magneziu și mangan a determinat o mărire cu până la 2 U/ml a activității amilolitice.

La tulpina alcalifilă *Bacillus sp.* No. A-59 (ATCC 21591) adăugarea în mediul de cultura a 0,5% DL-norvalină şi 0,5% D-metionină a mărit producerea de amilaze de 1,7 ori, dar a determinat şi o represie a creşterii microbiene.

În ţara noastră au fost realizate în cadrul Facultăţii de Biotehnologie, Bucureşti cercetări de izolare şi selecţie a tulpinilor aerobe alcalitolerante producătoare de amilaze utile în industria detergenţilor. În primele faze de cercetare, după etapele de screening şi identificare au fost selectate două tulpini bacteriene care au fost notate: *Bacillus* sp. ICCF 276 şi *Pseudomonas sp.* ICCF 277.

Tulpina alcalitolerantă şi termotolerantă *Bacillus* sp. ICCF 276 a fost izolată din apă minerală de la Izvorul nr. 7 din Băile-Herculane şi sintetizează α-amilaze alcaline active într-un domeniu larg de *p*H = (7,0–11,5) cu optimum la *p*H = 10,0 şi temperatura de 55°C. Enzima păstrează 58,46%, respectiv 61,53% din activitate la *p*H = 7,0 şi *p*H = 8,0. Amilaza este parţial inhibată de EDTA (5; 10 mM) şi de săruri (1–5 M NaCl), iar peste 45°C necesită ioni de calciu pentru a-şi menţine activitatea şi stabilitatea. Pentru a realiza îmbunătăţirea biosintezei la această tulpină s-a experimentat mutageneza/selecţia în trepte folosind doi agenţi mutageni: razele ultraviolete şi 1-metil-3-nitrosoguanidina. Acest tip de selecţie repetată a condus la ridicarea treptată a productivităţii în fiecare etapă a selecţiei, obţinându-se tulpina mutantă UV-NTG care a fost notată *Bacillus sp.* ICCF 290 (tabelul 13.9).

Tabelul 13.9

Rezultatele mutagenezei în trepte la tulpina *Bacillus sp.* ICCF 276

Agent mutagen	Tulpina bacteriană	Doza letală (LD_{50})	Nr. mutante testate	Tulpina selectată	I.A.	Mărirea A.E. [%]
Radiaţii UV	*Bacillus sp.* ICCF 276	26 sec.	112	*Bacillus sp.* ICCF 289	4	173.9
Nitrozoguanidină	*Bacillus sp.* ICCF 289	330 μg/ml	195	*Bacillus sp.* ICCF 290	5,8	252.2

Proprietăţile amilazei alcaline produsă de tulpina mutantă *Bacillus sp.* ICCF 290 încurajează utilizarea ei sub forma de aditiv la fabricarea detergenţilor biodegradabili pentru maşina de spălat vase sau a detergenţilor pentru spălarea manuală a rufelor colorate.

Descrierea procesului tehnologic de obţinere a alfa-amilazei alcaline cu tulpina Bacillus sp. ICCF 290

Preparare preinocul – creşterea tulpinii *Bacillus sp.* ICCF 290 pe mediul de întreţinere H II agarizat (8 tuburi), timp de 18–20 ore.

Preparare inocul: Inoculul pe mediul lichid, folosit la însămânțarea mediului de biosinteză, s-a preparat în două baloane Erlenmayer de 500 ml, fiecare conținând 75 ml mediu de întreținere H II lichid (raport de aerare 1:5). Baloanele Erlenmayer ce conțin mediul H II însămânțat cu preinocul (4 tuburi/balon), au fost menținute timp de 18–20 de ore la termostat, la temperatura de 30°C. Cultura bine dezvoltată (formată din celule aflate în faza logaritmică de creștere) a servit la însămânțarea mediului de biosinteză în raport de 5%.

Mediul de biosinteză conține (g/l):

- sursa de carbon: amidon solubil 1%;
- sursa de azot: făină de soia 1%;
- soluție de săruri minerale: KH_2PO_4 0,1%; $MgSO_4 \times 7H_2O$ 0,02%; $CaCl_2$ sicc. 0,1%; $ZnSO_4$ 0,001% și Na_2CO_3 (sterilizat separat prin filtrare sterilizantă);
- *p*H = 10,0.

Mediul a fost sterilizat prin autoclavare la 120°C, 20 min.

Condiții de cultivare:

- raport de inoculare 5%;
- debit de aer 180 l/h;
- agitare 200 rpm ;
- *p*H = 10,0 ;
- temperatură 30°C.

Activitatea amilolitică a tulpinii *Bacillus* sp. ICCF 290 pe mediul optimizat a fost 17,5 U DNS/ml/min Alfa-amilaza extracelulară, cu activitate optimă la *p*H = 9,0 este obținută din lichidul de cultură după filtrare (realizată pentru a îndepărta celulele microbiene) și poate fi folosită în această stare ca aditiv în compoziția detergenților.

13.5.4. Aplicațiile amilazelor alcaline

Aplicațiile enzimelor produse de microorganisme alcalifile sunt foarte variate, preparatele enzimatice alcaline fiind utilizate în diverse industrii (alimentară, la fabricarea hârtiei, detergenților, în farmacie și cosmetică, la prelucrarea pieilor de animale etc.), în cercetarea fundamentală (în chimia analitică, sinteze enzimatice etc.), în biodegradare și epurarea apelor reziduale.

Amilazele active în domeniul de *p*H alcalin, produse cu tulpini bacteriene alcalifile sunt utilizate cu precădere în industria detergenților. Amilazele și proteazele alcaline reprezintă 0,4–0,6 % din compoziția detergenților, iar prezența lor este asociată cu mărirea capacității de curățare (deoarece dizolvă și îndepărtează combinațiile proteine/amidon provenite din produsele alimentare) și conferă o culoare strălucitoare albiturilor.

Amilazele în asociere cu alte enzime produse de tulpini microbiene alcalifile/alcalitolerante au fost utilizate în studii de biodegradare și în procesele de epurare a apelor reziduale provenite din industria alimentară, industria

medicamentelor, din procesul de fabricare a hârtiei etc. Aceşti afluenţi industriali conţin o varietate de produşi organici reziduali (amidon, lignină, celuloză, materiale pectice etc.) şi prezintă un *p*H foarte ridicat. În prezent, în tehnologiile de epurare a acestor subproduse sunt preferate enzimele sintetizate de tulpini bacteriene alcalitolerante (active la *p*H = 7–10) active la temperaturi ridicate (90...130 °C).

Alte amilaze obţinute cu tulpini alcalifile de *Bacillus sp.*, care au capacitatea de a cataliza degradarea amidonului la ciclodextrine sunt valorificate în industria alimentară, farmaceutică şi cosmetică pentru diferite scopuri: emulsificatori, stabilizatori ai unor arome volatile, modificatori de gust şi de proprietăţi fizice, coloranţi etc.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

14. ENZIME CELULOZOLITICE

Biomasa lignocelulozică (BLC) constituită din reziduuri agricole (paie, coceni de porumb), unele subproduse ale industriei alimentare (pulpe epuizate de fructe, tăiței de sfeclă de zahăr epuizați), furajele și lemnele neutilizabile reprezintă o rezervă considerabilă și insuficient valorificată de glucide fermentescibile.

În ultimul deceniu s-au făcut eforturi considerabile în privința valorificării superioare a BLC. Orientarea principală a cercetărilor a fost transformarea prin fermentație a polizaharidelor constitutive, celuloza și hemiceluloza, și au apărut direcții de cercetare majore, ca hidroliza enzimatică a BLC, urmată de fermentația dirijată a produșilor rezultați (glucoza, pentoza). În prim planul obiectivelor vizate s-a aflat obținerea de carburant lichid, datorită debușeurilor resurselor disponibile.

Pentru hidroliza deșeurilor celulozice se utilizează, în general, procedee enzimatice sau procedee chimice, dar acestea din urmă au fost mai puțin agreate datorită efectului coroziv al agenților de hidroliză. Hidroliza enzimatică este preferată datorită condițiilor blânde în care poate avea loc și datorită specificității enzimelor față de anumite substraturi. Se folosesc în general enzime microbiene celulozolitice produse de diferite tulpini de microorganisme, ce produc în cantități apreciabile enzime care caracterizează hidroliza parțială sau totală a celulozei.

14.1. MICROORGANISME PRODUCĂTOARE DE CELULAZE

Există multe tipuri de microorganisme care au capacitatea de a digera materiale celulozice fie parțial, fie total. Dintre acestea cele mai importante sunt bacteriile (tabelul 14.1) și fungii.

Bacteriile. Deși multe specii de bacterii sunt capabile să sintetizeze enzime celulozolitice, puține sunt cele care prezintă interes industrial.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 14.1

Bacterii producătoare de celulaze

Bacterii termofile	*Clostridium thermocellum*
Bacterii mezofile	*Cellvilerio fulgus* *Pseudomonas fluorescens* *Ruminococcus sp.* *Cellulomonas sp.*

Bacteriile celulozolitice, atât Gram-pozitive cât şi Gram-negative, includ specii aerobe (din genul *Pseudomonas*), facultativ anaerobe (din genul *Cellulomonas*) şi strict anaerobe (din genul *Clostridium*).

Fungii. În timpul celui de-al doilea război mondial, Armata Statelor Unite ale Americii a suferit pierderi severe ale echipamentului şi uniformelor datorită atacului fungic în climatul cald şi umed din Pacificul de Sud. Fungii care au contribuit la acest dezastru au fost recoltaţi şi s-a alcătuit o colecţie, din care s-a izolat şi s-a caracterizat *Trichoderma reesei* (Reese şi Mandels, 1984). Tulpinile cunoscute sub această denumire (de fapt provenite din *Trichoderma viride*) constituie mucegaiul cel mai studiat şi probabil cel mai bun pentru biosinteza întregului sistem enzimatic celulozolitic. Cu toate acestea, se va exemplifica şi cu alte câteva specii de fungi care au fost selecţionate de diferiţi cercetători cu scopul declarat de a obţine buni producători de celulaze: *Trichoderma koningii*, *Penicillium funiculosum, Penicillium iriensis*, *Penicillium verruculosum, Fusarium solani, Aspergillus terreus, Aspergillus niger* etc.

14.2. HIDROLIZA ENZIMATICĂ A CELULOZEI UTILIZÂND PREPARATE CELULOZOLITICE DE ORIGINE MICROBIOLOGICĂ

Substratul natural al celulazelor este celuloza. Ea constituie componenta principală a pereţilor celulei vegetale. Se găseşte adesea în plante sub formă de fibre. Fibra de celuloză este constituită din diferite straturi succesive ale căror proprietăţi fizico-chimice şi mecanice conferă fibrei funcţionalitatea sa specifică.

Din punct de vedere chimic, fibra vegetală cuprinde trei constituenţi principali – celuloza, hemicelulozele şi ligninele.

Celuloza. Este un polimer insolubil, liniar, format (alcătuit) din unităţi de glucoză legate între ele prin legături de tip β-1,4. Gradul de polimerizare este de

ordinul a 10 000 unități moleculă. În stare naturală aceste molecule sunt asociate într-o structură fibrilară sau cristalină.

Hemicelulozele. Sunt heteropolizaharide cu un grad de polimerizare mai mic şi sunt mai uşor hidrolizabile decât celuloza. Constituenții principali sunt xiloza şi arabinoza (majoritare), glucoza (întotdeauna prezentă în cantități mici). Hidroliza hemicelulazelor furnizează pentoze nefermentescibile cu formare de etanol de către *Sacharomyces cerevisiae*, dar sunt în curs de cercetare alte căi de valorificare ale acestor heteroglucide.

Ligninele. Sunt polimeri tridimensionali de origine fenolică. Legăturile între monomeri sunt de diferite tipuri, multe dintre ele nehidrolizabile enzimatic. Produşii de degradare ai ligninelor sunt practic nefementescibili.

Celuloza, hemiçelulozele şi ligninele în stare naturală sunt insolubile în apă, iar pe de altă parte nu sunt direct accesibile enzimelor celulozolitice datorită structurii cristaline şi a diferitelor tipuri de legături care leagă cei 3 polimeri (forțe Van der Waals, punți de hidrogen, legături covalente). Datorită faptului că celuloza este practic „cimentată" de ceilalți doi polimeri, pentru o hidroliză cât mai completă se fac pretratări fizico-chimice ale biomasei ligno-celulozice cu vapori sub presiune, fie acide, fie alcaline.

Un substrat atât de complex ca BLC nu poate fi hidrolizat total de o singură enzimă. Sistemul enzimatic produs de *Tricoderma reesei* este, deci, un amestec de diferite enzime care cooperează între ele. Rezultatele cercetărilor efectuate au arătat că există două sisteme enzimatice principale, unul specific hemicelulozelor şi altul specific celulozei. Mecanismul de acțiune al enzimelor care hidrolizează hemicelulozele este asemănător cu cel al celulozelor, dar specificitatea lor de substrat este net superioară ultimelor.

Sistemul enzimatic celulozolitic care hidrolizează celuloza este compus în principal din trei clase de enzime:

– ***exoglucanazele***, care atacă molecula de celuloză la capătul nereducător al lanțului eliberând resturi de celobioză; ele mai sunt deci numite celobiohidrolaze;

– ***endoglucanazele***, care operează aleatoriu în interiorul lanțului de celuloză, creând astfel situsuri de atac suplimentare pentru exoglucanaze;

– ***celobiazele*** (β-glucozidazele), care hidrolizează celobioza, dar în acelaşi timp şi celotrioza şi celotetroza cu formare de glucoză.

În interiorul fiecărei clase pot exista mai multe enzime, sub diferite forme de izoenzime. În general aceste enzime sunt glicoproteine, cu variații mari ale componentei glucidice. Atât endoglucanazele, cât şi exoglucanazele şi β-glucozidaza au fost purificate din *Trichoderma reesei*.

Studiile de purificare şi fracţionare ale enzimelor din această subclasă au relevat faptul că toate cele 3 tipuri majore de enzime celulozolitice sunt biosintetizate de microorganisme în forme multiple, din care se pot izola un număr variabil de fracţiuni, atât în funcţie de natura mediului de cultură folosit cât şi de tehnicile utilizate.

Multe cercetări au demonstrat că diferite enzime acţionează în mod sinergic în hidroliza celulozei cu grad mare de polimerizare. Rolul β-glucozidazei în sinergismul reacţiei este uşor de explicat. În timp ce celobioza este un produs finit inhibitor al celobiohidrolazei, β-glucozidaza acţionează îndepărtând celobioza din amestecul de reacţie. S-a arătat că sinergismul dintre celobiohidrolază şi endoglucanază este foarte avansat în cazul substraturilor cu grad mare de polimerizare, mai slab în cazul substraturilor amorfe, cum este celuloza gonflată în prezenţă de acizi şi absent în cazul celulozelor solubile substituite (carboximetilceluloza).

Endoglucanaza acţionează asupra regiunilor amorfe din fibrele de celuloză deschizând noi capete de lanţ pentru atacul exoglucanazelor care, apoi, îndepărtează unităţile de celobioză de la capetele nereducătoare ale lanţului. Sinergismul dintre cele două enzime rezultă aşadar din faptul că noul substrat (capetele libere ale lanţurilor) pentru exoglucanaze este format în urma acţiunii endoglucanazelor.

Pentru biosinteza de β-glucozidază, cele mai potrivite sunt tulpinile de *Aspergillus niger, A. phoenicis, A. wentii*, β-glucozidaza produsă de aceste microorganisme fiind mai puţin sensibilă la inhibiţia prin produs finit decât cea biosintetizată de *T. reesei,* motiv pentru care s-au iniţiat fermentaţii mixte.

În fermentaţiile mixte se obţin preparate cu activităţi enzimatice mari ale celor trei enzime menţionate anterior, ba chiar şi pentru xilanaze, atunci când tulpina de *Aspergillus* este introdusă în fermentaţie la 15 ore de la începerea fermentaţiei cu tulpina de *Trichoderma.* Dezvoltarea tulpinii de *Trichoderma* este restricţionată de aciditatea puternică a mediului produsă de tulpina de *Aspergillus.*

14.2.1. Procedeul I.F.P. de transformare a biomasei ligno-celulozice

Procedeul studiat la „Institut Francais du Petrol" (I.F.P.) şi dezvoltat în ultimul deceniu are ca obiectiv hidroliza enzimatică a BLC şi fermentaţia zaharurilor obţinute, la acetonă-butanol (ABE). În figura 14.1 sunt schematizate principalele etape ale procedeului I.F.P. Biomasa lignocelulozică suferă mai întâi

un pretratament fizico-chimic destinat preparării materialului pentru hidroliza enzimatică.

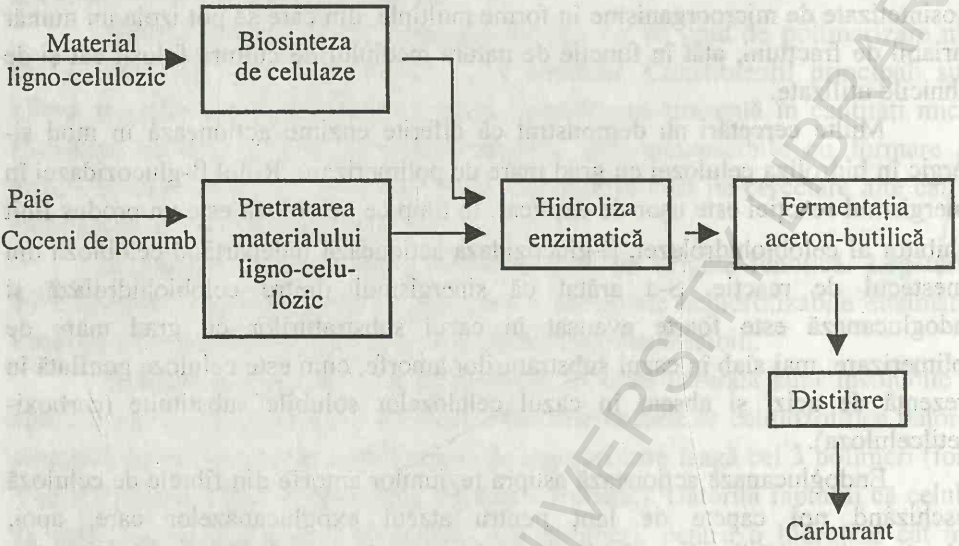


Fig. 14.1. Schema procedeului de producere de acetonă-butanol plecând de la biomasă ligno-celulozică.

În același timp, se realizează biosinteza de enzime celulozolitice prin fermentație, necesare tratamentului enzimatic. Preparatul enzimatic obținut prin fermentație nu necesită nici concentrare nici purificare. După hidroliza enzimatică a materialului ligno-celulozic pretratat se separă reziduul nehidrolizat, iar zaharurile obținute sunt transformate în solvenți prin fermentație acetono-butilică. Acești solvenți sunt apoi distilați, obținându-se un amestec format din aproximativ 2/3 butanol, 1/3 acetonă și urme de etanol.

14.2.2. Pretratări ale substratului ligno-celulozic

Ligninele sunt solubile la cald în medii alcaline, iar hemicelulozele sunt hidrolizate în medii slab acide și la cald. Din aceste proprietăți rezultă principalele trei tipuri de pretratări studiate.

Pretratare alcalină. Condițiile de mediu ale acestei pretratări sunt următoarele: peste substratul respectiv se adaugă 8–12% hidroxid de sodiu (procentele sunt exprimate în raport cu substanța uscată a acestuia), apoi se menține timp de 30–60 min la o temperatură între 80 și 120°C. Această tehnică este asemănătoare celei folosite în industria hârtiei. În cursul pretratării o parte din

lignine sunt solubilizate, la fel şi o parte din hemiceluloze, dar acestea suferă şi o degradare alcalină. Reziduul lichid rezultat în urma acestui tratament este identic celui obţinut în industria hârtiei şi pune probleme severe de eliminare sau recuperare de reactivi, în timp ce reziduul solid trebuie spălat şi neutralizat.

În aceste condiţii materialul vegetal pretratat prezintă o excelentă susceptibilitate la hidroliza enzimatică, dată atât de atacul hemicelulozelor şi ligninelor cât şi de efectul de gonflare cu sodă a fibrelor celulozice, care le face mai accesibile apei şi agenţilor hidrolizanţi.

Pretratare acidă. Acest tip de pretratare este folosit mai ales în scopul valorificării celulozei pentru obţinerea de etanol şi se bazează pe diferenţa de rezistenţă la hidroliză acidă dintre hemiceluloze şi celuloză. Pentru hidroliză se utilizează, în general, acid sulfuric în concentraţii de 1–3%. Temperatura şi durata tratamentului diferă în funcţie de tehnologia utilizată: fie la 200°C timp de 10 s (reactor „plug-flow"), fie la 120...130°C, timp de 30 min (reactor cu percolare).

La sfârşitul tratamentului, efluentul lichid conţine glucide (în special cu cinci atomi de carbon) provenite din hidroliza hemicelulozei. Reziduul solid conţine partea celulozică şi ligninele. Zaharurile sunt instabile în mediu acid, la cald, şi se pot degrada în compuşi aldehidici de tipul furfurolului. Aceşti produşi de degradare inhibă fermentaţiile şi de aceea alegerea condiţiilor experimentale este un compromis vizând o viteză de hidroliză a hemicelulozelor crescută, cu formare de produşi toxici incompatibili utilizării prin fermentaţie a glucidelor produse. Acest procedeu a fost studiat la scară pilot în Franţa la Societatea Bertin, în S.U.A. de către Tennessee Valley Authority şi în Noua Zeelandă de către Forest Research Institute.

Pretratarea cu vapori. În cursul pretratării prin hidroliză rapidă („steam explosion"), fibra vegetală este adusă rapid la temperatură înaltă (180...240°C) prin injecţie de vapori sub presiune.

Oprirea tratamentului se face prin decompresie explozivă. Trei fenomene pot fi puse în evidenţă în cursul acestei pretratări: o autohidroliză dată de eliberarea de grupări acetil substituite de numeroase zaharuri din structura hemicelulozelor; o fuziune a ligninelor urmată de recondensarea în picături după răcire, o destructurare intensă datorită eliberării explozive de produşi care se traduce prin creştere importantă a suprafeţelor accesibile. Aceste trei fenomene concură la ameliorarea hidrolizei enzimatice a fibrelor tratate. Acest tip de pretratare a fost promovat de societăţile canadiene Iotech şi Stacke şi a fost studiat de numeroase firme şi instituţii: Forintek (Canada), ASCAF (Franţa), Universitatea din Lund (Suedia).

Nici unul dintre cele trei tipuri de pretratări descrise anterior nu este total satisfăcător. Pretratările acide şi alcaline sunt greu de pus în funcţiune, consumul

de produşi chimici pentru reacţie şi neutralizare este apreciabil, iar datorită gradului mare de poluare se impune elaborarea de procedee de tratare şi recuperare a reactivilor. Pretratarea prin hidroliza rapidă (cu vapori) nu necesită aportul de produşi chimici şi în fermentaţiile acetono-butilice, însă eficacitatea este inferioară pretratării alcaline.

În prezent, se vizează combinarea avantajelor procedeului acid cu cele ale hidrolizei rapide. S-a constatat că dacă hidroliza cu vapori este efectuată pe un material ligno-celulozic acidifiat în prealabil, în anumite condiţii are loc o solubilizare totală şi o hidroliză a hemicelulozelor în monomerii lor, fără o degradare semnificativă cu formare de furfurol. Totodată, se observă o reacţie mai bună a celulozei la hidroliza enzimatică, existând astfel posibilitatea zaharificării complete a acestui polimer.

14.3. PRODUCŢIA DE ENZIME CELULOZOLITICE

Producţia şi caracterizarea enzimelor celulozolitice au făcut obiectul unui volum foarte important de cercetări fundamentale şi aplicative. Aceste cercetări mai întâi focalizate pe celulaze „sensu stricto" (hidroliza celulozei cristaline) au fost apoi direcţionate pe hemicelulaze, datorită interesului pentru potenţializarea acţiunii celulazelor pe material vegetal. Au fost identificate, clasificate şi secvenţializate genele principalelor enzime implicate, care au fost purificate şi multe dintre ele cristalizate. Structurile tridimensionale din ce în ce mai detaliate permit acum studierea şi modificarea principalelor regiuni funcţionale ale acestor molecule: situsul catalitic şi regiunile de absorbţie. De asemenea, s-au dezvoltat sistemele de transformare omoloage şi heteroloage. Calitatea acestor rezultate experimentale duce la deschiderea unor perspective foarte generoase, atât în vederea ameliorării performanţelor catalitice ale enzimelor cât şi a eficienţei producţiei lor. Pe de altă parte, în prezent, costul de producţie a acestor sisteme enzimatice s-a redus semnificativ graţie creşterii spectaculoase a cantităţii de enzime celulozolitice produse pe unitatea de volum de fermentaţie.

Microorganisme utilizate. Majoritatea procedeelor studiate la scară preindustrială, sau aplicate la scară industrială, utilizează enzimele produse în fermentaţie submersă de către ciuperca *Trichoderma reesei*. Această ascomicetă are avantajul că excretă, în cantităţi mult mai mari decât alţi fungi şi alte bacterii, amestecul de enzime care permite hidroliza atât a celulozelor amorfe, cât şi a celulozelor cristaline. Mutantele hiperproductive utilizate în prezent pot produce peste 40 g/l proteine solubile.

Medii de cultură. Sinteza de celulaze este supusă unei reglări complexe, dată de represia de către glucoză şi represorii catabolici uzuali şi inducerea biosintezei de către produşii de hidroliză ai celulozei. Din cauza acestor mecanisme de reglare, producţia de celulaze în fermentaţie submersă s-a efectuat mult timp în laboratoare, utilizând celuloza ca sursă unică de carbon şi energie. Calitatea celulozei era aleasă astfel încât hidroliza ei în cursul dezvoltării mucegaiului să fie suficient de lentă pentru a preîntâmpina acumularea de glucoză în timpul culturii. Era nevoie de celuloză purificată şi, deci, costisitoare. Pe de altă parte, concentraţia utilizată (50–70 g/l) producea o vâscozitate crescută a mediului de cultură. Datorită acestor motive de cost şi de vâscozitate, utilizarea acestui mediu de cultură nu a putut fi extrapolată la scară industrială. A fost, deci, necesară punerea la punct a unui mediu de cultură industrial bazat pe o sursă de carbon mai puţin scumpă şi cu o solubilitate redusă. Acest scop a fost atins prin utilizarea de tulpini mutante rezistente la represie catabolică.

S-a pus la punct un mediu de cultură în care lactoza este principala sursă de carbon şi energie. Alţi constituenţi ai mediului de cultură sunt sărurile minerale uzuale, necesarul de vitamine fiind acoperit prin adiţia a 1 kg/m^3 extract de drojdie sau extract de porumb („corn steep liquer"). Eliminarea de celulaze în mediul de cultură este facilitată de prezenţa agenţilor tensio-activi în mediul de fermentaţie (un aport de maximum 100 g/m^3 –Tween 80).

Cinetica fermentaţiei. În figura 14.2 este redată cinetica creşterii şi biosintezei de celulaze de către o tulpină ameliorată genetic de *Trichoderma reesei* pe un mediu de cultură bazat pe 6 % lactoză şi 0,5 % pastă de hârtie. Această fermentaţie a fost efectuată într-un reactor de 3 m^3, cu agitare mecanică; turaţia agitatorului a fost de 120 rot/min, aeraţia de 0,5 l aer /l mediu/ minut, la o temperatură de 27°C în primele 40 ore, apoi la 25°C; *p*H-ul lăsat liber în primele 20 de ore a fost apoi reglat la *p*H = 5. Creşterea mucegaiului induce o acidifiere a mediului care este neutralizat prin adiţie de amoniac, care serveşte şi ca aport de azot mineral. Fermentaţia pentru biosinteza de celulaze este relativ lentă, durata întregii operaţii depăşind 140 de ore.

S-a utilizat tehnica alimentării continue cu lactoză. Această tehnică, menţinând un nivel minim al conţinutului în lactoză reziduală pe tot timpul fermentaţiei, permite o potenţializare maximă a sintezei enzimelor (tabelul 14.2).

În figura 14.3 este exemplificată cinetica creşterii microorganismului şi biosintezei de celulaze utilizând această tehnică numită „fed-batch". Se constată că la un timp de cultură echivalent cantităţile de proteine şi activităţile enzimatice sunt practic duble celor obţinute prin metoda „batch". Acest procedeu este în momentul de faţă operat la scară industrială (fermentator de 30 m^3).

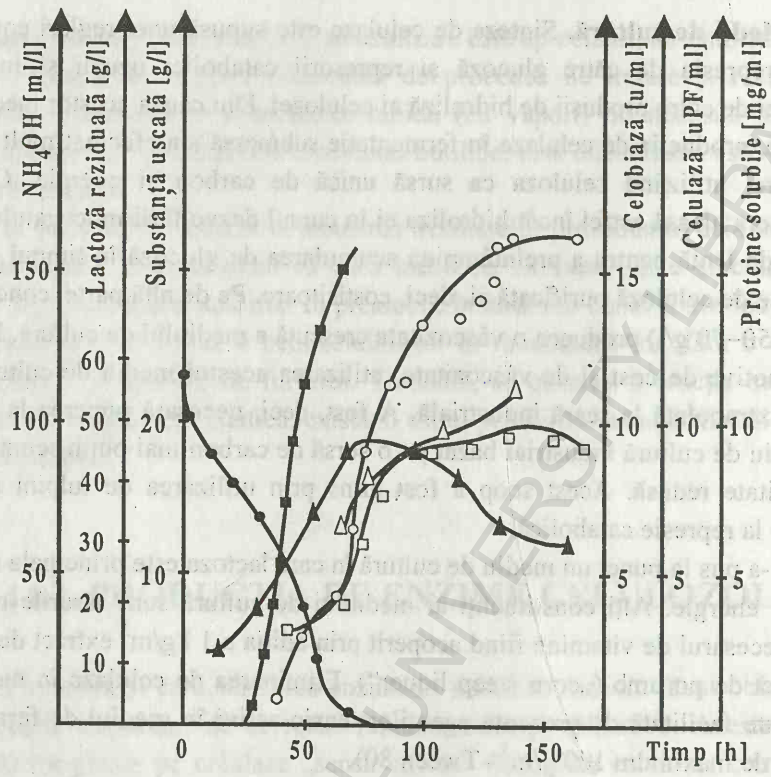


Fig. 14.2. Cinetica fermentației discontinue („batch") de producere a celulazelor cu tulpini de *Trichoderma reesei* cultivată pe mediu cu lactoză, în reactor de $3m^3$ (Barnett C.,1991):

•–• lactoză reziduală; ■–■ consumul de NH_4OH;
▲–▲ substanță uscată; o–o producția de proteine solubile;
Δ –Δ producția de celulaze; □–□ producția de celobiază.

Tabelul 14.2

Ameliorarea succesivă a procedeului de producție a celulazelor[1]

Materii prime folosite	Celuloză	Lactoză	Lactoză
Tehnologia	batch	batch	fed-batch
Activitate (uPF/ml)[2]	13,7	8,7	19,6
Proteine secretate [g/l]	17,9	14,7	13,1
Productivitate [uPF/l/h]	98	62	140
Preț de producție[3]	100	36	19

[1] Ansamblu de rezultate obținute cu tulpina ameliorată genetic CL-847.
[2] uPF = unități „paper filtre „.
[3] Exprimat în % față de prețul de producție al procedeului de referință: tehnologia celuloză batch.

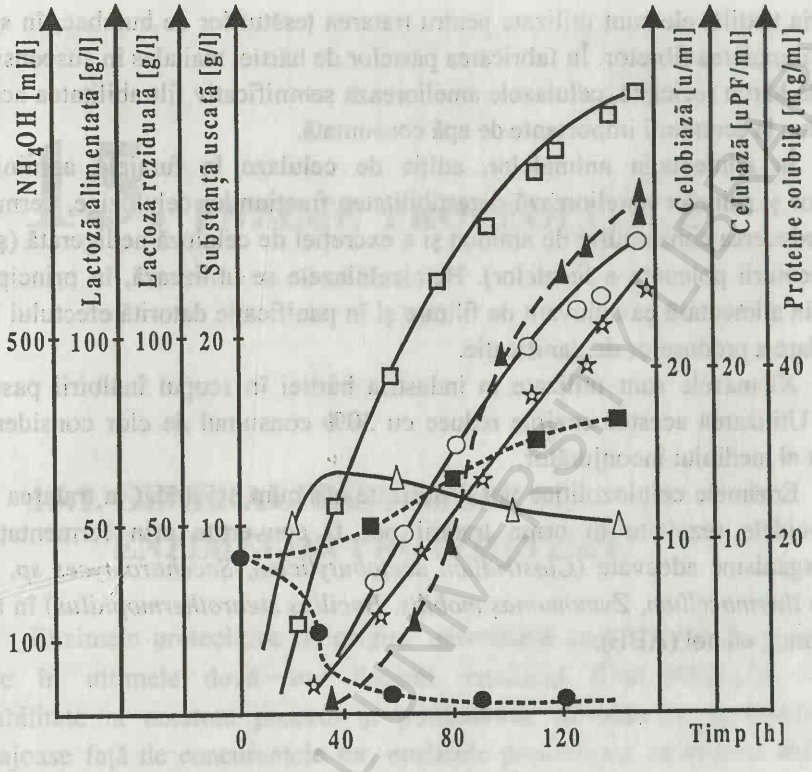


Fig. 14.3. Cinetica fermentației discontinue (cu adaosuri) cu tulpini de *Tricoderma reesei* cultivată pe mediu cu lactoză:

- •–• lactoză reziduală;
- ■–■ lactoză alimentată;
- □–□ consumul de NH_4OH;
- Δ–Δ substanță uscată;
- *–* producția de proteine solubile;
- o–o producția de celulaze.
- ▲–▲ producția de celobiază;

14.4. APLICAȚII ALE CELULAZELOR ȘI HEMICELULAZELOR

Datorită prețului de producție scăzut, acestor enzime li se deschid perspective interesante pentru diferite aplicații industriale. Pe lângă utilizarea cvasiconfidențială a unor celulaze în formule medicamentoase utilizate pentru unele deficiențe ale tractului gastro-intestinal, există patru piețe principale pe care se comercializează producții semnificative de celulaze și hemicelulaze.

În industria alimentară, celulazele sunt utilizate pentru a facilita filtrarea diverselor suspensii bogate în fibre celulozice manipulate în această industrie. În

industria textilă, ele sunt utilizate pentru tratarea țesăturilor de bumbac, în special pentru înmuierea fibrelor. În fabricarea pastelor de hârtie, mai ales în suspensiile de pastă de hârtie reciclată, celulazele ameliorează semnificativ filtrabilitatea acestora şi conduc la economii importante de apă consumată.

În alimentația animalelor, adiția de celulaze în furajele administrate păsărilor şi suinelor ameliorează digestibilitatea fracțiunilor celulozice, permițând, deci, reducerea consumului de amidon şi a excreției de celuloză nedigerată (şi deci a încărcăturii poluante a fecalelor). Hemicelulazele se utilizează, în principal, în industria alimentară ca adjuvant de filtrare şi în panificație datorită efectului lor de expandare a produselor de panificație.

Xilanazele sunt utilizate în industria hârtiei în scopul înălbirii pastei de hârtie. Utilizarea acestor enzime reduce cu 30% consumul de clor considerat un poluant al mediului înconjurător.

Enzimele celulozolitice pot fi utilizate aşa cum s-a arătat la tratarea BLC, iar glucidele rezultate în urmă tratării pot fi convertite prin fermentație cu microorganisme adecvate (*Clostridium acetobutylicum, Saccharomyces sp. Clostridium thermocellum, Zymomonas mobilis, Bacillus stearothermophilus*) în acetonă, butanol, etanol (ABE).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

15. ENZIME PROTEOLITICE

15.1. GENERALITĂȚI ASUPRA ENZIMELOR PROTEOLITICE

Enzimele proteolitice de origine microbiană s-au bucurat de o deosebită atenție în ultimele două – trei decenii, cunoscut fiind domeniul larg de aplicabilitate al acestora precum și posibilitatea de obținere în condiții mai avantajoase față de concurentele lor, enzimele proteolitice de origine animală și vegetală.

Protеazele microbiene constituie un grup complex de enzime hidrolitice, care diferă prin specificitatea de substrat, mecanismul de reacție, dependența activității enzimatice și stabilității de *p*H și temperatură. Acțiunea lor poate fi blocată, activată, sau inhibată într-o anumită proporție de agenți fizici, chimici sau biologici. Producția și caracteristicile acestora pot fi influențate prin selecția sușei producătoare și alegerea condițiilor de cultivare ale acesteia.

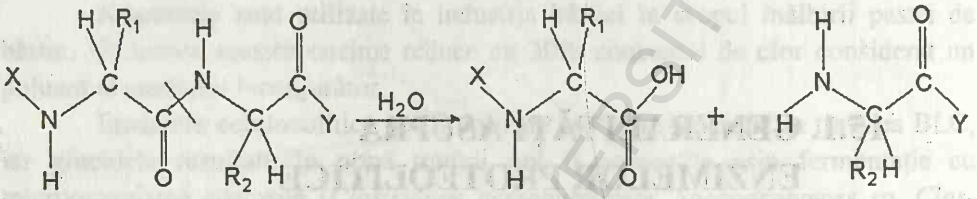
Enzimele din această categorie hidrolizează majoritatea proteinelor comune, cum ar fi: cazeina, hemoglobina, gelatina, albumina de ou, glutenul, proteina din soia și alte proteine vegetale și animale. Condițiile de hidroliză precum și randamentul operației în sine depind, însă, de natura, caracteristicile și gradul de puritate al preparatului enzimatic utilizat.

Numeroasele utilizări ale enzimelor proteolitice, în cele mai diferite domenii de activitate – industria alimentară, farmaceutică, agricultură, industria detergenților, medicină – au determinat demararea cercetărilor în vederea obținerii acestora pe cale biotehnologică, ținând seama în același timp de avantajele pe care le oferă utilizarea microorganismelor ca sursă biologică, precum și de proprietățile enzimelor microbiene.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

15.2. ENZIME IMPLICATE ÎN DEGRADAREA PROTEINELOR

Peptidhidrolazele – proteinazele (sau proteazele) şi peptidazele – cunoscute şi sub denumirea generală de enzime proteolitice, au capacitatea de a cataliza scindarea hidrolitică a legăturilor –CO–NH– peptidice din proteine, polipeptide şi oligopeptide până la peptide de diferite mase moleculare sau chiar la aminoacizi, cu fixarea componentelor apei, după reacţia generală:



În funcţie de proveniența lor, hidrolazele peptidice pot fi de origine vegetală, animală sau microbiană (produse de diferite bacterii, fungi, actinomycete). După locul în care îşi exercită acţiunea, proteazele pot fi intracelulare şi extracelulare.

În ultimele decenii, aprofundarea informaţiilor privind procesele şi diversificarea mijloacelor tehnice de cultivare a microorganismelor la nivel industrial, pentru obţinerea de aminoacizi, enzime, proteine, au determinat creşterea interesului pentru realizarea unor preparate enzimatice proteolitice din microorganisme în special din bacterii şi fungi. Interesul pentru astfel de preparate a crescut şi mai mult după anul 1965, când pentru obţinerea de detergenţi cu enzime, de tip „Biotex", s-au utilizat proteaze produse de *Bacillus licheniformis.*

Multe dintre microorganismele folosite la producerea de preparate proteolitice produc aceste enzime extracelular, ceea ce uşurează foarte mult condiţiile de prelucrare industrială pentru obţinerea de preparate enzimatice. Datorită acestui fapt, există în prezent tendinţa ca o serie de preparate proteolitice de natură vegetală sau animală să fie înlocuite cu preparate proteolitice microbiene care sunt, în general, mai ieftine şi de o mai mare diversitate.

15.2.1. Clasificarea enzimelor proteolitice

Proteazele sunt hidrolaze care, conform clasificării internaţionale (Comisia de Enzimologie: *International Union of Biochemistry* – I.U.B.), fac parte din subclasa 4, fiind cuprinse în subsubclasele E.C.3.4.21 – E.C.3.4.24.

Alături de proteaze în această subclasă sunt clasificate şi peptidazele cuprinse în subsubclasele având codurile E.C.3.4.11 – E.C.3.4.17. În figura 15.1 se prezintă schema clasificării hidrolazelor peptidice.

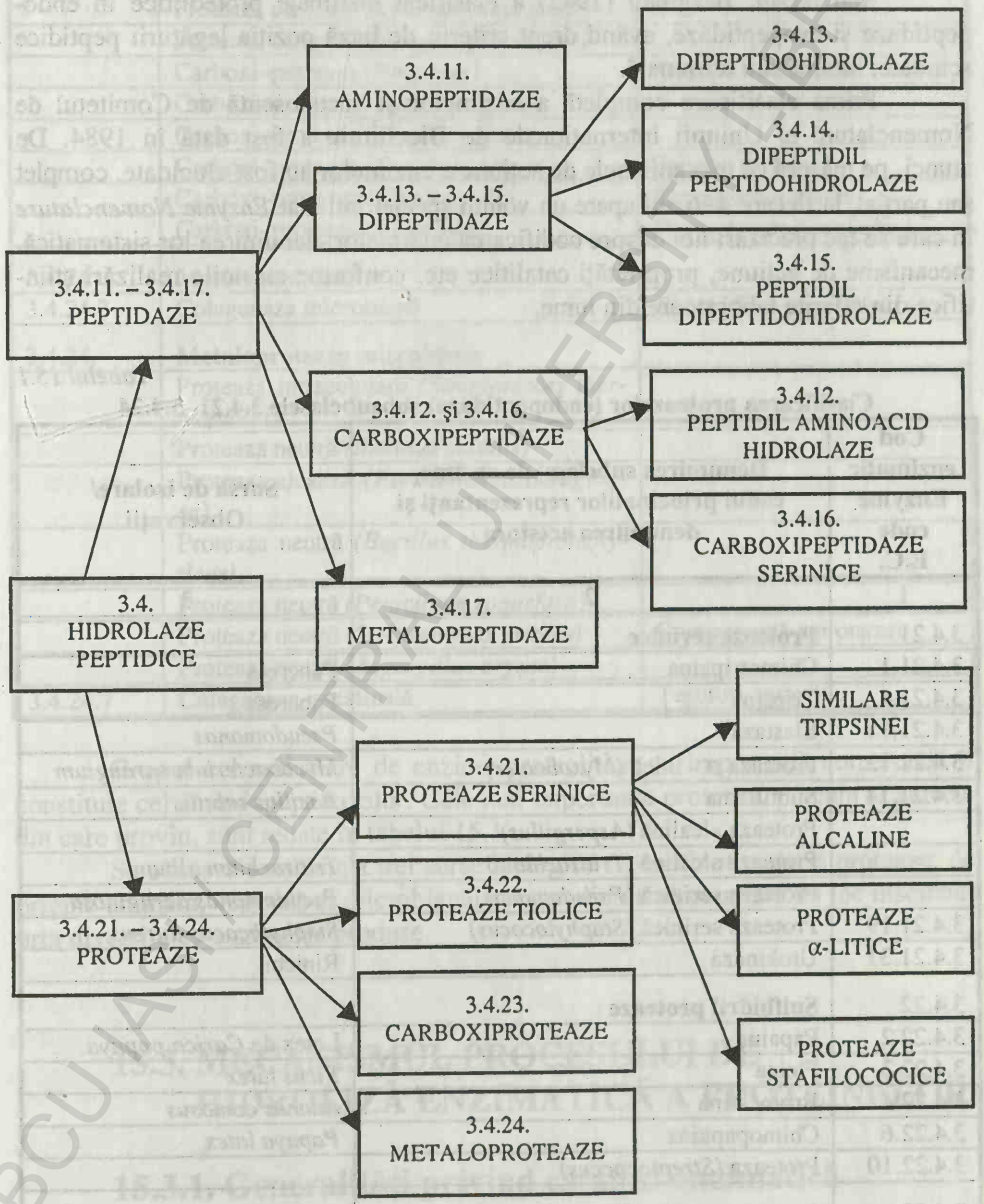


Fig. 15.1. Schema clasificării hidrolazelor peptidice.

BCU IAŞI CENTRU UNIVERSITAR

Prima clasificare a enzimelor proteolitice aparţine lui E. Abderhalden (1914), care le împarte în funcţie de mărimea moleculei substratului în peptidaze ce degradează polipeptidele şi proteinaze (proteaze) care acţionează asupra proteinelor.

Mai târziu, Bergman (1942) a clasificat enzimele proteolitice în endopeptidaze şi exopeptidaze, având drept criteriu de bază poziţia legăturii peptidice scindate, internă sau terminală.

Prima clasificare completă a enzimelor şi recunoscută de Comitetul de Nomenclatură al Uniunii Internaţionale de Biochimie a fost dată în 1984. De atunci, pe măsură ce mecanismele de acţiune a enzimelor au fost elucidate, complet sau parţial, la fiecare 4–6 ani apare un volum special intitulat *Enzyme Nomenclature* în care se fac precizări noi despre codificarea enzimelor, denumirea lor sistematică, mecanisme de acţiune, proprietăţi catalitice etc. conforme cu noile realizări ştiinţifice din diferite laboratoare din lume.

Tabelul 15.1

Clasificarea proteazelor (endopeptidaze) subsubclasele 3.4.21–3.4.24

Cod enzimatic Enzyme code E.C.	Denumirea subclasei de enzime, codul principalilor reprezentanţi şi denumirea acestora	Sursa de izolare/ Observaţii
1	2	3
3.4.21	**Proteaze serinice**	
3.4.21.1	Chimotripsina	Pancreas
3.4.21.4	Tripsina	Pancreas
3.4.21.11	Elastaza	*Pseudomonas*
3.4.21.12	Proteaza α - litică *(Myxobacter)*	*Mycobacterium sorangium*
3.4.21.14	Subtilizina	*Bacillus subtilis*
	Proteaza alcalină *(Aspergillus)*	
	Proteaza alcalină *(Tritirachium)*	*Tritirachium album*
	Proteaza serinică *(Pseudomonas)*	*Pseudomonas aeruginosa*
3.4.21.19	Proteaza serinică *(Staphylococus)*	*Staphylococus aureus*
3.4.21.31	Urokinaza	Rinichi
3.4.22	**Sulfhidril proteaze**	
3.4.22.2	Papaina	Latex de *Carica papaya*
3.4.22.3	Ficina	*Ficus latex*
3.4.22.4	Bromelaina	*Ananas comosus*
3.4.22.6	Chimopapaina	*Papaya latex*
3.4.22.10	Proteaza *(Streptococcus)*	
3.4.23	**Proteaze carboxilice acide**	
3.4.23.1	Pepsina A	Sucul gastric
3.4.23.2	Pepsina B	Sucul gastric
3.4.23.3	Pepsina C	Sucul gastric

Tabelul 15.1 (continuare)

1	2	3
3.4.23.6	**Proteaze carboxilice microbiene**	
	Proteaza carboxilică *(Aspergillus oryzae)*	
	Proteaza carboxilică *(Aspergillus saitoi)*	
	Proteaza carboxilică *(Aspergillus niger)*	
	Carboxi–proteaza *(Rhizopus)*	*Rhizopus chinensis*
	Carboxi–proteaza *(Mucor pusillus)*	
	Carboxi–proteaza *(Candida albicans)*	
	Carboxi–proteaza *(Saccharomyces)*	Drojdie de bere
	Carboxi–proteaza *(Rhodotorula)*	*Rhodotorula glutinis*
	Carboxi–proteaza *(Physarum)*	*Physarum polycephalin*
3.4.24	**Metaloproteaze**	
3.4.24.3	Colagenaza microbiană	*Clostridium histolyticus*
3.4.24.	**Metaloproteaze microbiene**	
	Proteaza intracelulară *(Streptomyces thermophilus)*	
	Proteaza neutră *(Bacillus subtilis)*	
	Proteaza alcalină *(Pseudomonas aeruginosa)*	
	Proteaza neutră *(Bacillus thermoproteolyticus)*	
	Proteaza neutră *(Penicilium roqueforti)*	
	Proteaza neutră *(Streptomyces griseus)*	Componentă a pronazei
	Proteaza neutră *(Aspergillus oryzae)*	
3.4.24.7	Colagenaza intestinală	Țesuturi animale

Grupul cel mai mare de enzime proteolitice cu importanță comercială îl constituie cel al endopeptidazelor. Cele mai importante proteaze, precum și sursele din care provin, sunt redate în tabelul 15.1.

Se observă existența a trei surse biologice cu conținut mare în proteaze: de origine animală, vegetală și microbiană, acestea din urmă ocupând un loc însemnat prin diversitatea enzimelor produse.

15.3. MECANISMUL PROCESULUI DE HIDROLIZĂ ENZIMATICĂ A PROTEINELOR

15.3.1. Generalități privind cataliza enzimatică

Deși mecanismul catalizei enzimatice nu este cunoscut în detaliu, s-au făcut mari progrese în această direcție prin studii cinetice și de specificitate, prin analiza chimică a situsurilor active ale enzimelor și prin comparație cu ajutorul

difracţiei de raze X, a structurii unor enzime şi a complecşilor lor cu substraturi mici sau inhibitori competitivi. Datele obţinute au permis elaborarea unor teorii privind mecanismul de acţiune al enzimelor a căror verificare în practică a fost dovedită, drumul rămânând deschis.

În general, cataliza enzimatică presupune existenţa a trei etape, care sunt prezentate în cele ce urmează.

Aproprierea şi orientarea substratului. Substratul se aproprie de situsul catalitic în aşa fel încât legătura sa susceptibilă să fie în imediata vecinătate a centrului catalitic activ al enzimei şi se orientează faţă de acesta astfel încât starea de tranziţie să fie formată uşor. Enzima acţionează prin încercarea de legare a substratului la centrul catalitic activ; astfel, în zona situsului se creează o concentraţie de substrat de cca 10 ori mai mare decât în restul soluţiei şi astfel viteza creşte cu acest ordin de mărime.

T. C. Bruice şi colaboratorii săi au arătat că aproprierea centrului catalitic activ de legătura susceptibilă a substratului este o reacţie favorizată de asistenţa anchimerică. Pe de altă parte, D. R. Storm şi D. E. Koshland Jr. au dezvoltat o teorie, postulând că funcţia majoră a situsului activ al enzimei este inducerea orientării orbitalilor şi anume: orbitalii substratului şi ai centrului catalitic se orientează într-o dispunere specifică, astfel încât complexul enzimă–substrat să treacă mai uşor în starea de tranziţie. S-au emis 3 ipoteze:

- *ipoteza orientării orbitalilor*;
- *ipoteza complementarităţii de tip lacăt – cheie*;
- *ipoteza adaptării induse*, ultima aparţinând lui Koshland, care pare cea mai apropiată de realitate.

Koshland a ajuns la concluzia că grupările funcţionale ale situsului activ al enzimei nu se află în poziţie optimă pentru cataliză, atunci când acesta este liber; moleculele de substrat impun acestora o conformaţie în care grupările catalitice au o poziţie geometrică favorabilă formării stării de tranziţie. Este ceea ce se numeşte o *adaptare indusă*. Moleculele de enzimă sunt instabile în forma activă şi, în absenţa substratului, tind să revină la forma liberă.

Formarea stării de tranziţie. Unele enzime se pot combina cu substratul, formând un intermediar covalent instabil, care se transformă repede în produşi de reacţie. În acest caz are loc o cataliză covalentă. Având grupări funcţionale capabile să doneze sau să accepte protoni, enzima poate determina o cataliză general - acidă sau bazică.

În cazul proteazelor, cercetările efectuate în scopul elucidării mecanismului catalizei enzimatice, s-a demonstrat formarea unui intermediar covalent foarte reactiv, care are o mai mare posibilitate de a atinge starea de tranziţie, permiţând astfel substratului să învingă bariera energiei de activare. Aceste enzime sunt clasificate în funcţie de aminoacidul cu care reacţionează substratul – sub-

clasele serinei, cisteinei, histidinei, lizinei. În subclasa serinei, gruparea hidroxil a restului de serină participă la formarea unui ester intermediar, fie cu o grupare acil, ca în cazul chimotripsinei, formând o acil-enzimă, fie cu o grupare fosforică, ca la fosfoglucomutază, pentru a forma o fosfoenzimă. Menționăm că în această subclasă sunt incluse serin-protează al căror mecanism de reacție și structură vor fi descrise în continuare.

Cataliza covalentă implică atacul unei grupări nucleofile a enzimei asupra atomului de carbon electrofil al substratului:

$$RX + Y^- \xrightarrow{\text{rapid}} RY + X^- \qquad Y^- - \text{nucleofil}$$

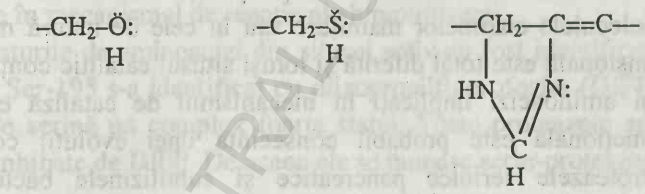
$$RY + H_2O \xrightarrow{\text{rapid}} ROH + Y^- + H^+$$

$$RX + H_2O \xrightarrow{\text{rapid}} ROH + X^- + H^+$$

Reacție fără catalizator:

$$RX + H_2O \xrightarrow{\text{lent}} ROX + X^- + H^+$$

Grupările nucleofile din enzimă au, în general, următoarele forme:



Pentru a avea loc cataliza nucleofilă este necesar ca substratul să reacționeze mai rapid cu catalizatorul nucleofil decât ar reacționa cu gruparea acil acceptoare finală; catalizatorul acilat astfel format trebuie, de asemenea, să reacționeze mai repede cu acceptorul acil final decât cu substratul inițial; astfel formarea intermediarului covalent poate coborî bariera energiei de activare a reacției prin implicarea transferului grupării acil.

Enzimele pot induce tensiuni și distorsiuni în legătura atacată a moleculei de substrat, făcând-o mai ușor degradabilă. Măsurătorile de rotație și cele efectuate prin metoda difracției cu raze X au demonstrat că enzimele suferă schimbări de conformație în cursul actului catalitic. Richard și colaboratorii săi au demonstrat că lanțul polipeptidic al enzimelor este astfel pliat încât resturile de aminoacizi care formează situsul catalitic activ sunt aduse într-o poziție foarte apropiată.

Există mai multe ipoteze referitoare la diferențele de conformație între enzima liberă și forma ei combinată cu substratul. Una dintre acestea susține că

situsul catalitic activ al enzimei libere nu se potriveşte exact nici cu substratul, nici cu produşii lui, ci doar cu speciile caracteristice stării de tranziţie. Inducţia deformează atât enzima cât şi substratul, făcându-le să atingă starea de tranziţie mult mai repede. S-a ajuns la concluzia că toţi trei factorii expuşi anterior contribuie la cataliza enzimatică.

Studiile de structură şi mecanism de acţiune al enzimelor proteolitice au demonstrat că acestea urmează aceleaşi etape în acţiunea lor de hidroliză enzimatică a proteinelor, indiferent de complexitatea structurală a proteinelor hidrolizate.

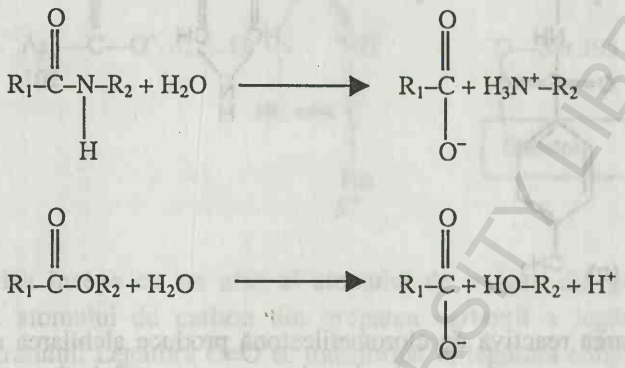
15.3.2. Mecanismul de acţiune al proteazelor

Studiile efectuate pe câteva sute de enzime proteolitice au relevat numai 4 mari tipuri de mecanisme catalitice, cele implicând serin-proteazele fiind predominante. Aceste studii de structură şi mecanism de reacţie au demonstrat că în cazul serin-enzimelor, indiferent de proveniența acestora (animală sau microbiană), mecanismul catalitic este acelaşi, cu toate că resturile de aminoacizi care intră în structura situsului catalitic ocupă poziţii diferite în secvenţa de aminoacizi în moleculele enzimelor mamifere sau în cele de natură microbiană. Structura tridimensională este total diferită şi totuşi situsul catalitic conţine acelaşi număr şi aceiaşi aminoacizi implicaţi în mecanismul de cataliză enzimatică. Similitudinea funcţională este probabil consecinţa unei evoluţii convergente independente. Proteazele serinice pancreatice şi subtilizinele bacteriene, de exemplu, au ajuns la acelaşi mecanism de hidroliză, dar independent, pentru că există un număr limitat de căi eficiente în mecanismul de scindare al legăturilor peptidice.

Diferitele moduri de evoluţie a procesului pot fi puse în evidenţă comparând structura şi modul de acţiune al chimotripsinei, enzimă pancreatică, cu cel al subtilizinei, enzimă bacteriană. Chimotripsina conţine 5 legături disulfurice, în timp ce subtilizina conţine 9. Secvenţa aminoacizilor în jurul situsului catalitic activ este foarte diferită, structura tridimensională este total diferită, însă situsul catalitic al subtilizinei conţine o triadă catalitică asemănătoare cu a chimotripsinei. De aceea, mecanismul de reacţie al serin-proteazelor este, în general, ilustrat în totalitate de modul de acţiune al chimotripsinei.

Chimotripsina este o endopeptidază având o specificitate de substrat de reacţie şi de grup. Astfel, este selectivă pentru legăturile peptidice de la capătul carboxilic al moleculei, atacând pe cele la care participă resturile de tirosină,

triptofan, fenilalanină şi metionină. Ea hidrolizează, de asemenea, legăturile ester. De aceea, mecanismul chimotripsinei poate fi studiat prin hidroliza esterilor simpli:

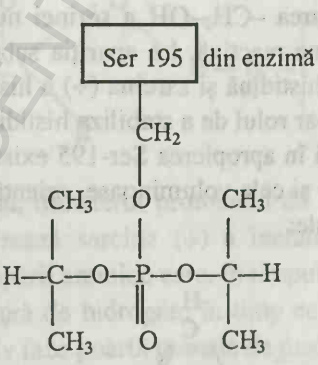


Cu ajutorul difracţiei de raze X s-a studiat şi s-a dovedit că structura conformaţională a chimotripsinei permite formarea triadei:

Asp – His – Ser
(102) (57) (195)

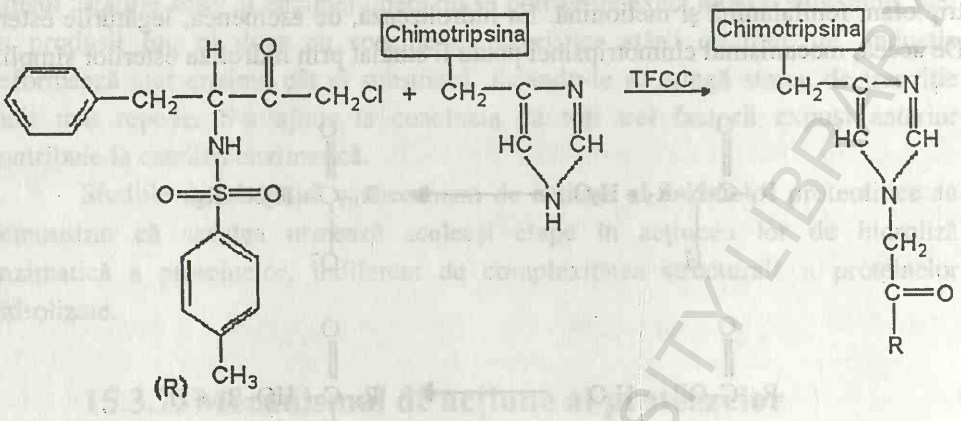
cu rol cheie în mecanismul de reacţie al chimotripsinei.

Resturile de aminoacizi din situsul activ au fost identificate prin metodele cunoscute: Ser-195 s-a identificat cu diizopropilfluorofosfat (DIFP) care formează cu restul de serină un complex foarte stabil. Toate proteazele aparţinând acestei clase sunt inhibate de DIFP. De aceea ele se numesc serin-proteaze:



Rolul catalitic al His-57 a fost demonstrat prin marcare fină cu tosyl-L-fenilalaninclorometilcetonă (TFCC):

BUJIASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Gruparea reactivă de clorometilcetonă produce alchilarea restului His-57, conducând la un compus complet inactiv, care poate fi izolat printr-o hidroliză exhaustivă a tuturor legăturilor peptidice ale enzimei. Trei considerente indică faptul că His-57 face parte din situsul catalitic activ:

– reacţia este stereospecifică, întrucât izomerul D al TFCC este total ineficace;

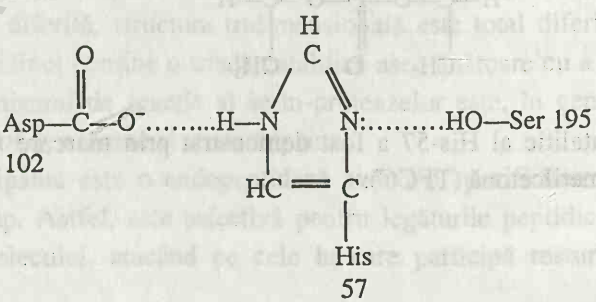
– reacţia este inhibată competitiv de β-fenilpropionat, care este cunoscut ca un inhibitor al chimotripsinei;

– viteza de inactivare cu TFCC variază cu *p*H-ul în acelaşi mod ca şi reacţia necatalizată.

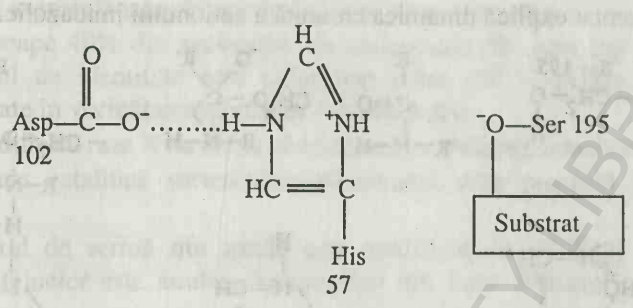
Mecanismul reacţiei enzimatice catalizate de chimotripsină demarează, aşa cum s-a arătat anterior, prin apropierea şi orientarea enzimei faţă de substrat.

În mod obişnuit, gruparea $-CH_2-OH$ a serinei nu este foarte reactivă şi totuşi în chimotripsină ea devine reactivă. La apariţia substratului, protonul de la hidroxilul serinei se prinde de histidină şi sarcina (+) a histidinei este contracarată de restul de aspartat care are doar rolul de a stabiliza histidina în starea de tranziţie. Studiile cu raze X au stabilit că în apropierea Ser-195 există un „buzunar" nepolar în care intră resturile aromatice şi cele voluminoase, orientându-se spre legătura cu Ser-195. Mecanismul de atac este:

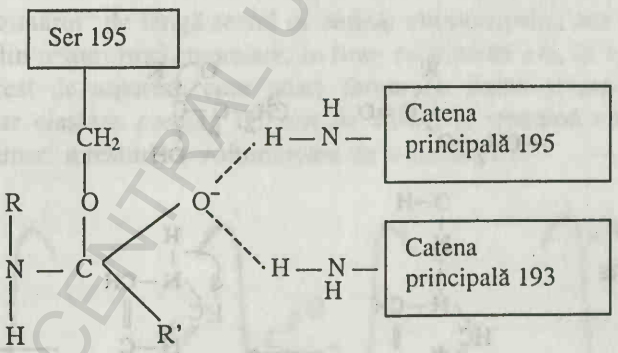
– fără substrat:



– cu substrat:



Hidroliza începe cu un atac al atomului de oxigen din gruparea OH a serinei asupra atomului de carbon din gruparea carboxil a legăturii peptidice atacate a substratului. Legătura C=O se transformă în legătură simplă cu oxigenul încărcat negativ C–O⁻. Al patrulea atom care se va lega de carbon se va aranja în tetraedru. Formarea intermediarului tetraedric dintr-o grupare de amidă plană este posibilă datorită legăturii de hidrogen formate între sarcina negativă a oxigenului (numit oxyanion) şi două grupări N–H din catenele principale ale enzimei:



În primul stadiu, transferul protonului de la serină la histidină este uşurat de Asp^- care neutralizează sarcina (+) a inelului histidinic. Protonul legat de histidină este donat grupării aminice care, în timpul stării de tranziţie, este legată de histidină printr-o legătură de hidrogen, în timp ce componenta *acil* este legată de substrat; din acest motiv faza poartă numele de *fază de acilare.*

În al doilea stadiu, deacilarea, o moleculă de apă ocupă locul aminei. Protonul provenit de la H_2O se leagă de histidină, iar $(HO)^-$ format atacă atomul C din legătura ester–enzimă, formându-se din nou intermediarul tetraedric (fig. 15.2).

Recent s-au efectuat studii privind stabilitatea intermediarului tetraedric prin alchilarea chimotripsinei şi tripsinei cu tosilfenilalanilclormetan marcat 1-C^{13} şi 2-C^{13} şi obţinerea de produşi de inhibiţie a căror cinetică a putut fi studiată. S-a

pus astfel în evidență caracterul nucleofil deschis al grupării OH din Ser-195, iar modelul prezentat explică dinamica crescută a cationului imidazolic.

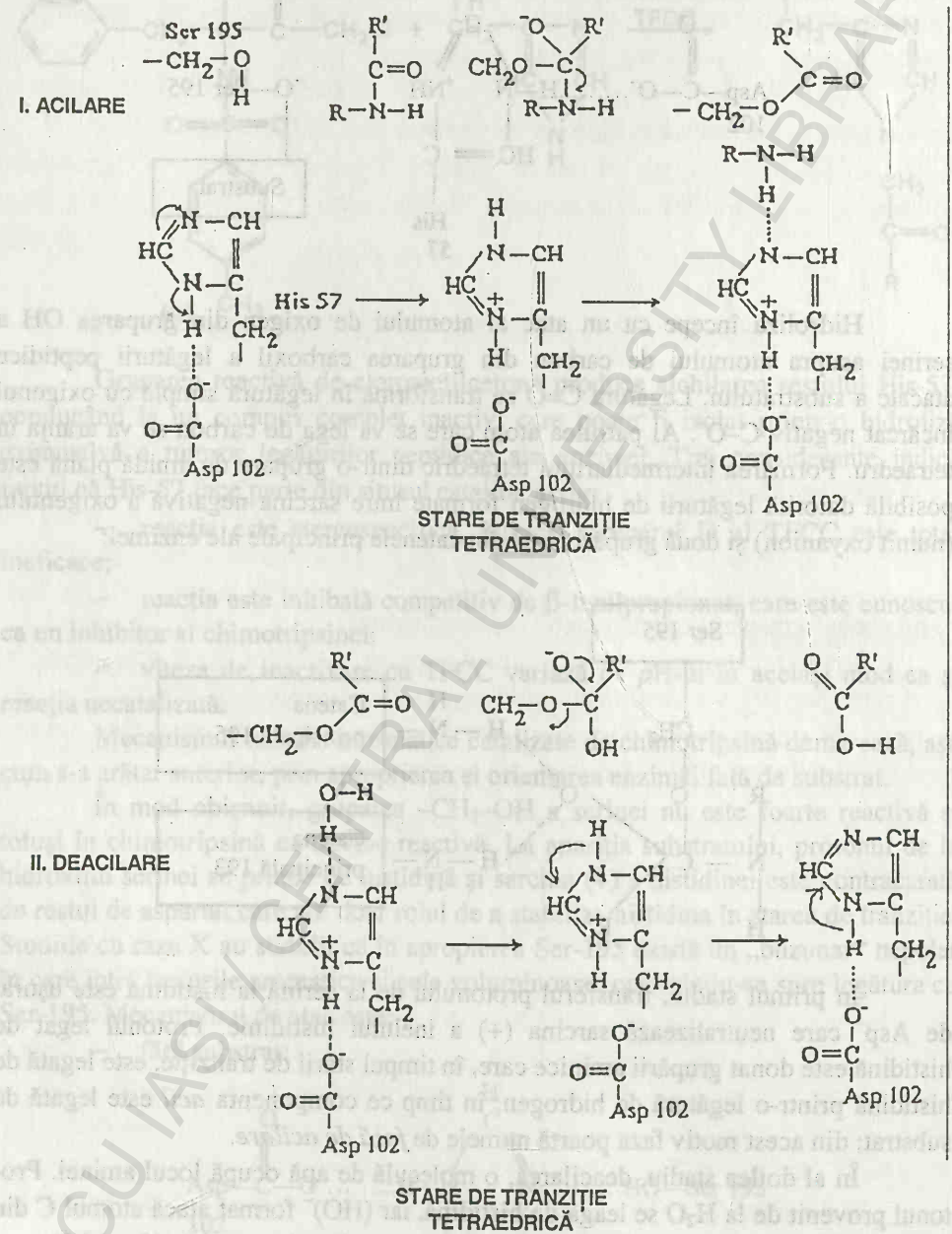


Fig. 15.2. Mecanismul de acțiune al serin-proteazelor.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tripsina şi elastaza sunt alte două enzime digestive din clasa serin-proteazelor. Ele sunt asemănătoare chimotripsinei sub câteva aspecte:

– aproape 40% din secvenţele de aminoacizi din cele trei enzime sunt identice. Gradul de identitate este chiar mai mare (60%) pentru resturile de aminoacizi situate în vecinătatea centrului catalitic activ;

– studiile cu raze X au arătat că structura lor tridimensională este similară;

– triada catalitică serină-histidină-aspartat este prezentă şi în aceste serin-proteaze;

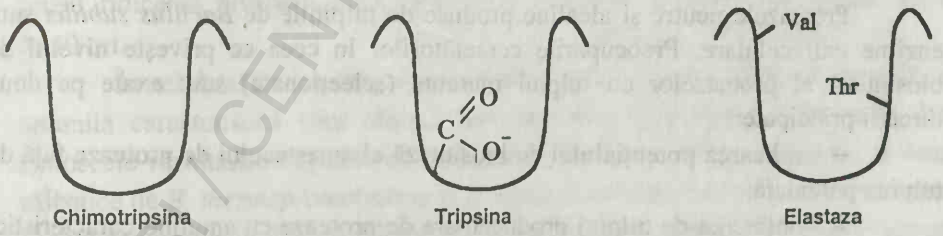
– restul de serină din triadă este modificat de DIPF şi procesul de hidroliză a proteinelor este anulat. Aminoacizii din jurul situsului catalitic activ sunt aceiaşi;

– toate trei enzimele au un mecanism catalitic identic. Triada catalitică şi oxanionul din fiecare enzimă conduc la formarea stării de tranziţie tetraedrică;

– aceste enzime sunt secretate de pancreas ca precursori inactivi şi se activează prin scindarea unei singure legături peptidice.

Cele trei enzime diferă doar prin specificitatea lor de substrat. Astfel, chimotripsina hidrolizează resturile aromatice şi voluminoase, tripsina hidrolizează resturile de lizină şi arginină, elastaza hidrolizează resturi puţin voluminoase ale unor aminoacizi monoaminocarbocilici, care nu pot disocia.

Din analiza cu raze X s-a constatat că ele diferă în ceea ce priveşte aşezarea în „buzunarul" de lângă restul de serină: chimotripsina are un „buzunar" alcătuit numai din resturi mici, nepolare, în timp ce tripsina are, în locul unui rest de serină, un rest de aspartat, care poate forma cu lizina şi arginina legături electrostatice, iar elastaza conţine un rest de valină şi treonină care nu permit intrarea în „buzunar" a resturilor voluminoase de aminoacizi.



15.4. MICROORGANISME PRODUCĂTOARE DE ENZIME PROTEOLITICE

Microorganismele producătoare de proteaze fac parte din diverse grupe sistematice: bacterii, fungi, actinomicete.

Dintre **bacteriile** cel mai des citate în literatura de specialitate ca bune producătoare de enzime proteolitice amintim:

- *Bacillus subtilis*;
- *Bacillus pumillus*;
- *Bacillus amylosacchariticus*;
- *Bacillus amyloliquefaciens*;
- *Bacillus stearothermophylus*;
- *Bacillus thermoproteolyticus*;
- *Bacillus licheniformis*.

Dintre **fungii** producători de proteaze menționăm:

- *Aspergillus sojae*;
- *Aspergillus flavus*;
- *Aspergillus niger*;
- *Aspergillus oryzae*;
- *Rhyzopus oryzae*.

Printre **actinomycete**, producători mai importanți de proteaze sunt:

- *Streptomyces liquefaciens*;
- *Streptomyces griseus*.

Microorganismele aparținând speciilor *Bacillus subtilis* și *Aspergillus oryzae* sunt cele mai utilizate în producția de proteaze, existând un volum mare de informații în acest domeniu. Este necesar să menționăm că activitatea de biosinteză a proteazelor este scăzută la tulpinile izolate din surse naturale, de aceea în majoritatea cazurilor sunt utilizate tulpini selecționate, tehnicile de selecție constituind un domeniu specific și important al geneticii microorganismelor.

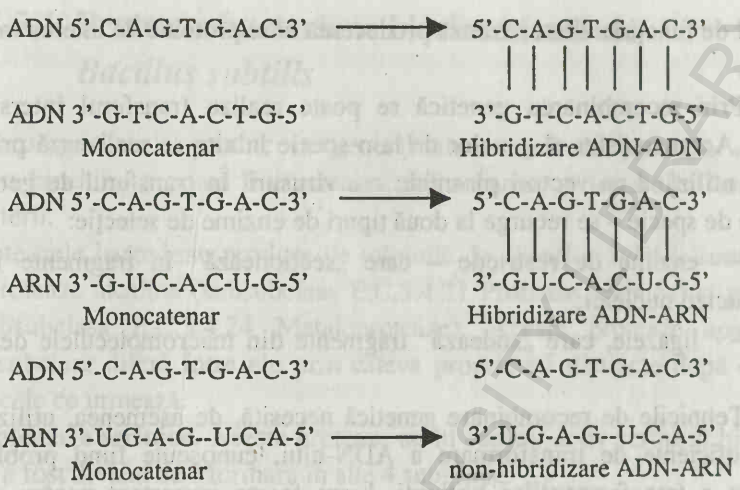
În general, atât producătorii naturali, cât și tulpinile selecționate produc un amestec de enzime proteolitice, care diferă între ele atât în ceea ce privește *p*H-ul optim (acid, neutru, alcalin), cât și prin specificitatea lor de acțiune. Din acest motiv, pentru fiecare microorganism în parte se specifică tipul de proteaze produs cu preponderență. Astfel, microorganismele aparținând speciei *Bacillus subtilis* sunt cunoscute ca producătoare de proteaze neutre și alcaline, iar microorganismele aparținând speciei *Aspergillus oryzae* sunt producătoare de proteaze acide, neutre și alcaline.

Proteazele neutre și alcaline produse de tulpinile de *Bacillus subtilis* sunt enzime extracelulare. Preocupările cercetătorilor în ceea ce privește nivelul de biosinteză al proteazelor cu tulpini mutante (selecționate) sunt axate pe două direcții principale:

- ridicarea potențialului de biosinteză al amestecului de proteaze față de tulpina parentală;
- obținerea de tulpini producătoare de proteaze cu anumite caracteristici (de exemplu, active în domeniul de *p*H alcalin sau proteaze termostabile).

În primul caz, o modalitate pentru obținerea de tulpini în cantități apreciabile și cu activitate enzimatică mare care biosintetizează enzime este inducerea de mutanți (selecție inductivă) și obținerea de variante active prin diferite metode (adaptarea, hibridizarea, transducția etc.).

Procedura de hibridizare rezidă în „legarea" a două fragmente monocatenare de acizi nucleici și constituirea unei structuri dicatenare stabile. Pentru realizarea hibridizării este necesară existența omologiei, caracterizată prin complementaritatea secvențelor de nucleotide. Hibridizarea se produce între monocatene identice (ADN–ADN) sau diferite (ADN–ARN).



Omologia dovedeşte fie existenţa unei provenienţe comune a catenelor (ADN dicatenar iniţial), fie existenţa unei „interrelaţii de matriţă" în cadrul sintezei cu încorporarea deoxiribonucleotidelor (prin replicare sau retrotranscripţie).

În scopul sesizării fragmentelor hibridizate se face marcarea uneia din catene prin legarea nucleotidelor marcate cu ^{32}P sau ^{3}H în prezenţa timidinkinazei (similar procedeului de secvenţializare).

Conform datelor din literatura de specialitate, mutagenii cei mai eficienţi sunt: nitrozoetiluree, nitrozometiluree, nitrozoguanidina, dietilsulfatul, precum şi agenţi fizici (radiaţii X, radiaţii γ, neutroni rapizi). Astfel, prin mutageneză s-a reuşit ridicarea nivelului de biosinteză a tulpinilor de *Bacillus subtilis* de cca 8–10 ori.

În cel de-al doilea caz, majoritatea tulpinilor producătoare de proteaze cu o anumită caracteristică s-au obţinut prin inginerie genetică. Astfel, sunt foarte cunoscute rezultatele obţinute de cercetătorii japonezi care, pornind de la tulpini sălbatice de *B. thermoproteolyticus* şi *B. stearothermophilus*, au reuşit obţinerea de tulpini producătoare de termolizină, o protează foarte diferită de celelalte proteaze neutre atât în ceea ce priveşte termostabilitatea cât şi mecanismul de acţiune.

În prezent, cunoscând structura termolizinei precum şi gena răspunzătoare de caracteristicile deosebite ale acestei proteaze, foarte mulţi cercetători încearcă obţinerea de tulpini de *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, producătoare de proteaze asemănătoare acesteia, utilizând tehnica clonării sau tehnica mutagenezei *in situ*.

În biologia moleculară se utilizează curent metode prin care se urmăreşte clonarea de gene şi recombinarea genetică. Aceste metode sunt destinate izolării unei anumite gene, bine definită în ansamblul genomului. După izolare, se urmăreşte purificarea, amplificarea şi, eventual, funcţionalitatea acestei gene.

Aspectul de funcționalitate vizează producerea unei proteine de interes medical sau biologic.

Prin recombinarea genetică se poate realiza transferul interspecific al genelor. Acest transfer al genelor de la o specie la alta se realizează prin metode speciale utilizând ca vectori plasmide sau virusuri. În transferul de gene – peste barierele de specie – se recurge la două tipuri de enzime de selecție:

– enzime de restricție – care „secționează" în fragmente macromoleculare acizii nucleici;

– ligazele, care „sudează" fragmente din macromoleculele de acizi nucleici.

Tehnicile de recombinare genetică necesită, de asemenea, utilizarea unor metode eficiente de transformare a ADN-ului, cunoscute fiind problemele de stabilitate a transformanților obținuți, lucru foarte important pentru un proces biotehnologic. Aplicarea tehnicilor de transformare de protoplaşti, electroporare, transducție, conjugare au condus în unele cazuri la rezultate spectaculoase. De exemplu, în cazul biosintezei enzimelor proteolitice s-au obținut microorganisme cu potențial crescut de circa 4–5 ori în producerea lor.

15.5. STRUCTURA ŞI PROPRIETĂȚILE ENZIMELOR PROTEOLITICE MICROBIENE

Literatura de specialitate recentă referitoare la structura proteazelor microbiene demonstrează importanța acestor cercetări în ingineria genetică, a cărei dezvoltare pune la îndemâna cercetătorilor tehnici şi metode de obținere a unor enzime cu însuşiri speciale. De exemplu, cunoaşterea structurii enzimelor proteolitice produse de *Bacillus stearothermophilus* prin detectarea exactă a secvenței de aminoacizi răspunzătoare de termostabilitatea acestor enzime, înțelegerea fenomenului şi efectuarea de modificări în structura enzimei prin metoda mutagenezei directe *in situ*, astfel încât această proprietate deosebit de importantă pentru protează să poată fi îmbunătățită. De exemplu, mărirea termostabilității s-a efectuat prin înlocuirea Ala^{170} cu un rest de serină. Simularea dinamică a moleculei a arătat că $serina^{170}$ stabilizează enzima prin formarea unei legături de hidrogen cu restul unui alt aminoacid. Prin apariția grupării hidroxil din Ser^{170}, enzima devine mai stabilă prin „umplerea" unei „cavități interne".

15.5.1. Proteaze bacteriene biosintetizate de *Bacillus subtilis*

Microorganismele produc în general amestecuri de proteaze a căror caracterizare biochimică poate fi efectuată după separare şi testare în funcţie de anumite criterii.

Proteazele bacteriene produse de tulpinile de *Bacillus subtilis* sunt amestecuri de proteaze alcaline (subsubclasa E.C.3.4.21 Proteaze serinice) şi proteaze neutre (subsubclasa E.C.3.4.24 Metaloproteaze). Aceste proteaze aparţinând diferitelor subclase diferă între ele prin câteva proprietăţi distincte după cum se prezintă în cele ce urmează.

Proteazele serinice. Aceste proteaze au în centrul activ serina şi histidina. Acest grup a fost divizat de Morihara în alte 4 subgrupe:

- proteaze similare tripsinei;
- proteaze alcaline;
- proteaze *Myxobacter* α-litice;
- proteaze stafilococice.

Proteazele similare tripsinei cuprind, în afară de tripsină şi chimotripsină, enzime biosintetizate de specii de *Streptomyces,* care hidrolizează legăturile Arg^{22} – Gly^{23} şi Lys^{29} – Ala^{30} din lanţul B-insulinic, această specificitate de substrat fiind trăsătura distinctivă. Aceste enzime acţionează la *p*H = 8,0, au temperatura optimă de cataliză 50°C, sunt inhibate de diizopropilfluorfosfat (DIFP), *p*-cloromercurilbenzoat (PCMB), tosil-L-lizin-clorometilcetonă (TLCK) şi de inhibitorul tripsinei izolat din soia. Activitatea lor nu este influenţată de etilendiaminotetraacetat (EDTA) şi de acidul iod-acetic (IAA). Enzimele prezintă şi activitate esterazică şi amidazică.

Proteazele alcaline, a doua grupă de proteaze serinice, sunt biosintetizate de bacterii, drojdii şi fungi, fiind prezente şi în ţesuturile animale. În această grupă se încadrează şi proteazele alcaline produse de unele tulpini de *Bacillus subtilis* şi cele fungice din *Aspergillus oryzae.* Aceste proteaze au acţiune specifică faţă de resturile de aminoacizi aromatici sau hidrofobi care participă cu gruparea carboxil la legătura care se scindează; *p*H-ul optim de acţiune este cuprins între 9 şi 11, dar rămân active şi în domeniul de *p*H 5–9. Aceste proteaze sunt inhibate de DIFP, inhibitorul izolat din cartofi, fluorura de fenil-metil-sulfonil (PMSF). Activitatea lor nu este influenţată de TLCK, tosil-L-fenilalanin-clorometilcetonă (TPCK), EDTA, orto-fenantrolină (OP). În plus, proteazele alcaline serinice au activitate esterazică mare pe Cbz-aminoacizi, *p*-nitrofenilester (PNE), hidrolizând în general esterii terminali simpli. Proteazele alcaline au mase moleculare cuprinse între 25 000 şi 30 000 Da. Din acest grup fac parte proteazele cunoscute sub denumirea de subtilizine sau subtilopeptidaze. S-a constatat că aceste proteaze nu sunt

exclusiv produse de *Bacillus subtilis* ci, în general, de bacterii ale genului *Bacillus*, astfel încât s-a propus numele generic de *Bacilopeptidaze*. Pot fi clasificate în două grupe:

– *Bacilopeptidaze A*, care cuprind: subtilizină Carlsberg, protează alcalină din *B. licheniformis*, protează alcalină din *B. pumilis*;

– *Bacilopeptidaze B* care includ: subtilizină NOVO, protează alcalină din *B.subtilis NRRL B3411*, subtilizină BNP (Bacterial Protease Nagarse), protează alcalină din *B. subtilis* var. *amylosacchariticus*.

În prezent nu se poate face o diferențiere precisă între grupele A și B, chestiunea rămânând deschisă.

Metodele de examinare a amestecurilor de enzime produse de diferite microorganisme au arătat că microorganismele producătoare de *Bacilopeptidaze A* nu produc proteaze neutre sau amilază, în timp ce microorganismele producătoare de *Bacilopeptidaze B* produc proteaze neutre și amilază în același timp.

Metaloproteazele. Sunt proteaze activate de ionii metalici legați de centrul catalitic activ al enzimei (Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}). Ele pot fi grupate în: metaloproteaze neutre și metaloproteaze alcaline.

Metaloproteazele neutre conțin de obicei Zn^{2+} și prezintă specificitate de substrat față de aminoacizii hidrofobi implicați cu gruparea amino în legătura peptidică. Ele au un *p*H optim de acțiune cuprins între 7 și 8, sunt inhibate complet de EDTA (care complexează atomul de Zn^{2+} din structură) fiind sensibile la concentrații de EDTA sub 10^{-3} m, orto-fenantrolină. DIFP și PCMB nu scad activitatea acestor enzime. Metaloproteazele neutre au mase moleculare cuprinse între 35 000 și 45 000 Da.

Metaloproteazele alcaline conțin, de asemenea, un ion metalic implicat în mecanismul de reacție catalitică. Ele își manifestă activitatea optimă în domeniul de *p*H 7–9, fiind mai puțin inhibate de EDTA decât proteazele neutre, necesitând concentrații mai mari de 10^{-3} m EDTA pentru inactivare.

Reprezentanții cei mai importanți ai metaloproteazelor sunt proteazele neutre de origine bacteriană (*Bacillus sp.)* și de origine fungică (*Aspergillus sp.*). Proteazele neutre produse de diferite specii de microorganisme au structură și specificitate de reacție diferite. Astfel, proteazele neutre produse de *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus* sunt diferite de proteazele neutre produse de *Bacillus subtilis NRRL B 3441* și din acest motiv este necesară specificarea exactă a provenienței proteazei neutre respective.

Studiile de specificitate și structură a proteazelor neutre purificate din *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus* s-au efectuat în 1972 de către Tsuru prin modificarea chimică a unor resturi de aminoacizi din molecula enzimei. Modificarea chimică a resturilor tirozil prin acetilare cu acetilimidă, nitrare cu tetranitrometan sau iodurare provoacă pierderea activității enzimatice datorită

împiedicării sterice care se produce la interacțiunea dintre enzimă și substratul cu masă moleculară mare. Ionizarea resturilor tirozil reduce activitatea hidrolitică a enzimei față de substanțele cu masă moleculară mai mică, iar fotooxidarea restului histidinic este critică pentru activitatea enzimatică. Modificarea unui rest triptofanil prin tratare cu N-bromsuccinimidă determină o autodigerare rapidă și degradarea enzimei cu formare de peptide cu masă moleculară mică. Aceasta demonstrează că restul triptofanil are un rol funcțional de stabilizare a moleculei de enzimă. Studii de specificitate ale enzimelor proteolitice au fost efectuate și prin scindarea legăturilor peptidice din catenele A și B ale insulinei. În ceea ce privește proteazele microbiene, datele de literatură de specialitate consultate se referă numai la acțiunea acestora asupra catenei B a insulinei. Astfel, prin studii efectuate cu peptide sintetice și prin examinarea produșilor de hidroliză ai catenei B a insulinei s-a demonstrat că proteazele neutre din *Bacillus subtilis* sunt endopeptidaze care scindează preferențial legăturile peptidice formate de gruparea amino a leucinei sau a fenilalaninei.

Relativ recent Morihara a studiat structura proteazei neutre din *Bacillus subtilis var. amylosacchariticus* prin fotooxidare în prezența albastrului de metilen, tratament prin care enzima a fost rapid inactivată. Enzima inactivă a fost hidrolizată cu endoproteinază fungică, peptidele rezultate fiind separate prin HPLC, iar secvența aminoacizilor s-a comparat cu cea a enzimei native. S-a văzut astfel că dintr-o peptidă lipsește His^{228} față de prima formă, indicând că ea a fost fotooxidată. Aceasta sugerează că His^{228} este implicată în reacția catalitică a proteazei neutre.

Studiul computerizat a 5 metaloproteinaze cunoscute a condus la cunoașterea regiunii din structura acestora, răspunzătoare de termostabilitatea lor. Astfel s-a ajuns la concluzia că proteazele din *Bacillus amyloliquefaciens* și *Bacillus subtilis* pierd 2 Ca^{2+} legați de situsul catalitic activ datorită substituirilor $Asp–Ser^{57}$, $Asp–Thr^{59}$ și $Asp–Pro^{200}$, în timp ce termolizina din *Bacillus thermoproteolyticus* și proteaza din *Bacillus stearothermophilus* conservă 3 Ca^{2+} legați de acest situs, iar proteaze cu termostabilitate intermediară din *Bacillus cereus* pierd numai un atom de Ca^{2+} substituindu-l cu Lys^{197}. Multiplele substituții înăuntrul regiunii 91–101, 150–154 și 275–280 corespund, de asemenea, unei scăderi a termostabilității proteinazei. Prin analiză cu raze X a termolizinei s-a determinat că aceste regiuni sunt aranjate spațial împreună, fiind localizate lângă α-helixul central opus situsului catalitic activ, întreținând contactul între capetele N și C terminale.

Termolizina produsă de *Bacillus thermoproteolyticus* este o metal–neutral proteinază tipică, cu specificitate față de resturile hidrofobe sau voluminoase de aminoacizi, localizate la extremitatea aminoterminală a punctului de sciziune a substratului peptidic sau proteic. Ea se deosebește de toate celelalte proteaze neutre

prin stabilitatea neobişnuită (în soluţie reţine cca 90% din activitate după 30 min, la 70°C), activitate maximă la *p*H cuprins între 7,0 şi 9,0, în timp ce alte proteaze au un maxim de activitate la *p*H între 7,0 şi 7,5. De asemenea, ea are o specificitate de substrat deosebită de a celorlalte proteaze, catalizând şi reacţia inversă de sinteză a di- şi tripeptidelor. Această enzimă a fost foarte mult studiată şi descrisă de Morihara. Studiile s-au efectuat pe o enzimă produsă de *Bacillus thermoproteolyticus Rokko,* care a fost izolată de Endo.

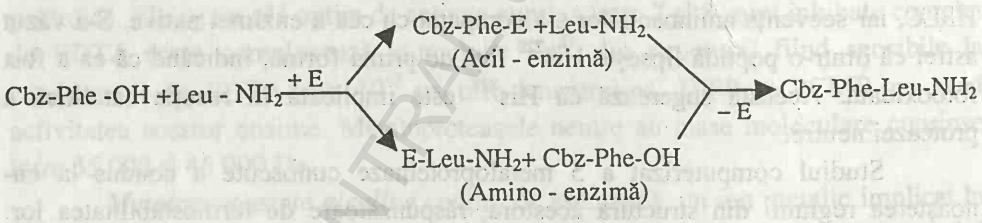
Isowa şi colaboratorii au fost primii care au arătat că termolizina poate cataliza reacţiile de sinteză a peptidelor:

$$\text{Cbz–X–OH+Y–OMe (ori Y–NH}_2\text{)} \longrightarrow \text{Cbz–X–Y–OMe (ori Cbz–X–Y–NH}_2\text{)}$$

Din studiul reacţiilor de transpeptidare s-a dedus că termolizina, catalizând aceste reacţii, urmează ambele căi *acil* şi *amino-intermediar*, în funcţie de substrat. Un mecanism similar a fost propus pentru pepsină. Pe de altă parte, un mecanism *acil-enzimă* s-a stabilit pentru reacţia cu α-chimotripsină.

Studiile au arătat că termolizina este un catalizator foarte bun pentru cuplarea Cbz–Phe–OH şi Leu–NH_2.

S-a postulat următoarea cale de sinteză:



Viteza reacţiei de sinteză este determinată de intermediarul acil- sau amino-enzimă, deoarece acesta devine un virtual substrat. Urmează faza rapidă de deacilare sau deaminare care este asemănătoare celei din cataliza uzuală.

Numeroase studii au indicat că termolizina are o activitate de sinteză foarte mare în comparaţie cu α–chimotripsina. Acest fapt poate fi atribuit exclusiv activităţii catalitice şi nu diferenţei de mecanism catalitic.

Structura termolizinei a fost mult studiată, determinându-se compoziţia în aminoacizi: Asp 43, Thr 23, Ser 23, Glu 20, Pro 8, Gly 36, Ala 28, Cys 1, Val 24, Met 2, Ile 18, Leu 17, Tyr 29, Phe 10, Lys 12, His 9, Arg 10, Trp 5, NH_3 38. O altă compoziţie a fost raportată pe baza determinărilor de masă moleculară de către H.Matsubara. Secvenţa terminală de aminoacizi dată de Matsubara este Ile–Thr–Gly–Thr. Masa moleculară a termolizinei determinată prin metoda echilibrului de sedimentare este de 37 500 Da.

Alți autori au studiat structura termolizinei prin RMN, obținând informații privind conformația acesteia. Astfel s-a constatat că în porțiunile 233–248, 258–276 și 299–316 fiecare fragment conține câte un α–helix.

Studiile comparative de structură a termolizinei și a proteazelor neutre înrudite au arătat că în timpul catalizei structura enzimei respective suferă deplasări ale legăturilor în punctele de articulare. S-au studiat trei proteaze bacteriene neutre din familia termolizinei: enzima din *Bacillus thermoproteolyticus,* proteaza neutră din *Bacillus cereus* și elastaza din *Pseudomonas aeruginosa,* toate trei în formă liberă sau legată de un ligand. Fiecare enzimă conține un domeniu N-terminal și C-terminal cu un situs catalitic activ funcțional formând două domenii. Comparând diferitele enzime, s-a constatat că în interiorul domeniilor structura este bine conservată, dar există deplasări ale unui domeniu față de celălalt de aproape 16°. Această mișcare de domenii poate fi corelată cu prezența sau absența unui inhibitor. Legarea inhibitorului apare ca fiind asociată cu reducerea unghiului de deplasare cu 6 – 14° și scăderea „șanțului" de lângă situsul catalitic activ cu aproximativ 2Å. Determinarea densității electronice în situsul catalitic activ al enzimei arată că aceasta ar corespunde mai mult unui complex inhibitor–enzimă sau unui complex enzimă – produs, decât unei enzime libere cum se presupusese.

Studiile de structură oferă informații despre stabilitatea termolizinei. Interiorul cavității hidrofobe a fost studiat prin tehnica mutagenezei directe de situs, efectuându-se modificări de aminoacizi și apoi studii de stabilitate. Efectele drastice asupra activității enzimatice au fost produse de următoarele substituții: $Leu^{284} \rightarrow Trp$ și $Met^{168} \rightarrow Trp$. La 50°C enzima și-a pierdut ireversibil 50% din activitate, în 30 de minute. Aceste rezultate pot fi explicate prin efectul determinat de mutații. De asemenea, pot fi luate în considerare atât configurația locală a enzimei care predispune la autoliză, cât și alterarea miezului hidrofob ale enzimei native.

Un studiu amănunțit al specificității de substrat al termolizinei efectuat prin hidroliza proteinelor a evidențiat că termolizina hidrolizează legături peptidice în care sunt implicate grupări amino ale aminoacizilor hidrofobi cu catene voluminoase: izoleucină, leucină, valină, fenilalanină, metionină și alanină. Cu toate acestea, locul unde se găsesc aminoacizii tirozină, glicină, treonină și serină este, de asemenea, foarte important pentru procesul de hidroliză. Acest din urmă caz s-a observat în special când timpul de hidroliză este mai lung sau raportul de concentrații enzimă/substrat este mai mare. Hidroliza la nivelul restului de triptofan nu este nici pe departe clară. În tabelul 15.2 sunt date legăturile peptidice din diferite proteine și peptide hidrolizate de termolizină. Pe lângă aceste cazuri a fost evidențiată și hidroliza legăturilor: Tyr–Glu[19], Thr–His[23], Thr–Asn[24],

Ser–$CySO_3H^{24}$, Gly–His^{24}, Thr–Asn^{27}, His–Asn^{26}, Arg–His^{21}, Gly–$CySO_3H^{24}$ şi Glu–Thr^{28}. Totuşi, nu este clar dacă aceste hidrolize sunt cauzate de termolizină sau de enzimele contaminante. Studii efectuate cu substraturi sintetice au condus la aceleaşi rezultate ca în cazul utilizării de substraturi naturale.

Termolizina nu are activitate amidazică şi esterazică, dar are o puternică activitate elastazică.

Termolizina nu rupe legătura peptidică ce conţine gruparea carboxil a prolinei, indiferent de prezenţa sau absenţa restului de aminoacid ataşat de aceasta. Termolizina are aceeaşi specificitate şi la temperaturi extreme. Specificitatea mică a termolizinei face ca ea să fie folosită în studiile de determinare a secvenţei aminoacizilor în proteine. Şi alte enzime proteolitice au acţiune asemănătoare termolizinei, catalizând reacţia de sinteză a diferitelor peptide, însă modul de acţiune este diferit, randamentele sunt mai mici, termolizina fiind enzima proteolitică cel mai mult utilizată în acest scop.

Tabelul 15.2

Resturile de aminoacizi implicaţi în hidroliza cu termolizină

R_2	R_1
Ile	Lys, Arg, Cys (Cm)*, Asp, Glu, Asn, Gln, Thr, Ser, Pro, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe
Leu	Lys, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Thr, Ser, Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Tyr, Phe, Trp
Val	Lys, Arg, Cys (Cm)*, Asp, Glu, Asn, Gln, Thr, Ser, Pro, Gly, Leu, Tyr, Phe, Trp, Lys (Me)**
Phe	Lys, Arg, Asp, Glu, Gln, Thr, Ser, Gly, Ala, Met, Leu, Phe
Ala	Lys, Arg, $CySO_3H$, Asp, Asn, Thr, Ser, Ala, Tyr, Phe
Met	Lys, Asp, Gly, Ala, Leu, Tyr, Gln
Tyr	Arg, Gln, Tyr, Phe, Lys, Ala
Thr	Lys, His, Arg, Ser, Tyr
Ser	Arg, Ser, Ala, Tyr, Phe
Gly	Thr

* – S-carboximetilcisteină; ** – ε-N-metillizină.

15.5.2. Proteaze fungice din *Aspergillus oryzae*

Microorganismele de *Aspergillus oryzae* produc un amestec de proteaze acide, neutre şi alcaline, cele neutre fiind preponderente. Proteaza neutră fungică este o metaloprotează tipică şi are proprietăţi caracteristice asemănătoare cu cele enumerate pentru proteazele bacteriene. Studiind structura proteazelor alcaline produse de *Aspergillus oryzae,* un grup de cercetători japonezi au stabilit că acestea

au secvențe de aminoacizi similare subtilizinelor și că resturile de aminoacizi Asp^{41}, His^{72} și Ser^{228} formează situsul catalitic activ.

Dintr-un amestec de enzime produs de *Aspergillus oryzae* prin cromatografie pe DEAE Sephadex A-50 și Bacitracin-Sepharose 4B, a fost izolată o protează serinică având o activitate optimă în domeniul de *p*H 6,7–8,2. Proteinaza este complet inhibată de fenil-metil-sulfonilfluorură și diizopropilfluorofosfat și are pH_i la *p*H = 7,5. Masa moleculară a serin-proteinazei este 30 000 Da. Compoziția în aminoacizi este: Met_2, Asp_{33}, Thr_{18}, Ser_{29}, Glu_{21}, Pro_9, Glu_{32}, Ala_{38}, Val_{24}, Ile_{16}, Leu_{15}, Tyr_8, Phe_8, His_8, Lys_{18}, Arg_4, Trp_6. Secvența terminală a serin-proteazei este: Gly-Leu-Phe-Thr-Gln-Lys-Ser-Ala-Pro-Trp-Gly-Gln-Leu-Gly-Ser-Ile-Ser-Lys-Gly-Gln-Gln-Ser-Thr-Asp-Tyr-Ile-Tyr. Această secvență coincide practic cu secvența corespunzătoare proteinazei din *Aspergillus oryzae,* tulpina *ATCC20386.*

Similar subtilizinelor, această enzimă catalizează condensarea leucin- și alanin-*p*-nitroanilidelor cu esterii metilici ai N-benzil-oxicarbonil-alanil-alanină și glicil-alanină.

15.6. METODE DE IZOLARE ȘI SELECȚIE A MICROORGANISMELOR PRODUCĂTOARE DE ENZIME PROTEOLITICE

Microorganismele capabile să producă enzime proteolitice, într-o oarecare măsură, pot fi izolate din diferite habitate: sol, aer, apă, din diferite alimente, furaje, produse vegetale.

Metodele clasice de *screening* al microorganismelor cu potențial proteolitic se bazează pe proprietatea enzimelor biosintetizate de a hidroliza proteinele adăugate în mod intenționat în mediul de cultură. Practic, metoda constă în cultivarea acestora în plăci Petri pe mediu agarizat ce conține cazeină la temperatura optimă specifică tulpinii respective și determinarea zonelor de hidroliză (transparente) ce apar în jurul coloniilor. Dacă se dorește izolarea de enzime proteolitice active într-un anumit domeniu de *p*H, se modifică de la început *p*H-ul cazeinei și mediului agarizat la valoarea dorită.

15.6.1. Metoda inoculării pe un mediu minimal

Metoda inoculării pe un mediu minimal poate fi aplicată atât pentru selecții naturale ale tulpinilor cât și pentru selecția celor supuse anterior unui proces de mutageneză. De exemplu, această metodă a fost utilizată pentru selecția tulpinilor

de *Bacillus subtilis* şi *Aspergillus oryzae* cultivate pe medii minimale specifice (SMM şi respectiv MAM descrise în subcapitolele 15.7.1 şi respectiv 15.9.2) [Ioniţă A. şi colab., 1998].

Materialul de lucru pentru iradiere în cadrul lucrărilor de mutageneză efectuate la tulpinile de *Bacillus subtilis* a fost suspensia de celule în mediu minimal dezvoltată timp de 6 ore pe agitatorul rotativ cu 220 rot/min, la 31°C, aflată la sfârşitul fazei logaritmice de creştere.

Activitatea proteolitică a tulpinilor mutante, obţinute prin cultivarea acestora pe mediul de fermentaţie minimal, timp de 48 de ore, în condiţii de agitare la temperatura de 31°C, s-a determinat prin metoda Anson.

În cazul tulpinii *Aspergillus oryzae*, pentru mutageneză a fost folosită suspensia de celule obţinută pe un mediu minimal timp de 60–64 de ore, în condiţii de agitare la 220 rot/min, la 31°C, aflată la începutul fazei staţionare de creştere.

Din suspensia de celule mutagenizate, coloniile au fost izolate prin însămânţare pe medii agarizate cu YPG şi incubate la 31°C, timp de 72 de ore. Coloniile izolate au fost apoi cultivate pe mediul martor (*M*), determinându-se activitatea proteolitică în lichidul extracelular.

15.6.2. Metoda difuziei radiale

Metoda difuziei radiale se bazează pe acţiunea enzimelor asupra substanţelor specifice incluse în gel de agar sau agaroză şi evidenţierea produşilor de reacţie, care apar sub forma unor zone de difuzie, prin tehnici colorimetrice specifice. Proporţionalitatea dintre diametrul zonelor de difuzie şi activitatea enzimatică permite selectarea acelor tulpini care produc enzimele de interes într-o cantitate satisfăcătoare.

Difuzia radială în gel de agar s-a utilizat ca metodă de *screening* pentru selectarea tulpinilor de *Bacillus subtilis*, producătoare de proteaze alcaline.

Metoda s-a aplicat în două variante care sunt prezentate în continuare:

– pentru mutantele izolate din suspensia de celule iradiate şi dezvoltate pe mediul minimal, inocularea s-a realizat pe mediul cu geloză nutritivă, conţinând 0,1% cazeină în tampon Tris HCl 0,1 m, la *p*H = 8,5. După incubare 18 ore la 31°C, în jurul coloniilor se pot evidenţia zone de hidroliză al căror diametru s-a comparat cu cel al tulpinilor parentale;

– mutantele izolate din suspensia de celule iradiate s-au dezvoltat pe mediul minimal timp de 18 ore pe agitatorul rotativ. După cultivare, în lichidul de cultură obţinut prin filtrare, activitatea enzimelor proteolitice s-a determinat prin difuzie radială în gel de agar 1%, conţinând cazeină 0,1% în tampon Tris HCl 0,1 m, la *p*H = 8,5. După o incubare de 18 până la 20 ore, la 33°C, plăcile s-au imersat în fixator (acid acetic – etanol – apa) (2:60:38), timp de 2 ore şi apoi în

Amidoblack 0,1%, timp de 15 minute. După spălări repetate în acid acetic 7%, zonele de difuzie apar sub forma unor pete albe pe un fond albastru (fig. 15.3).

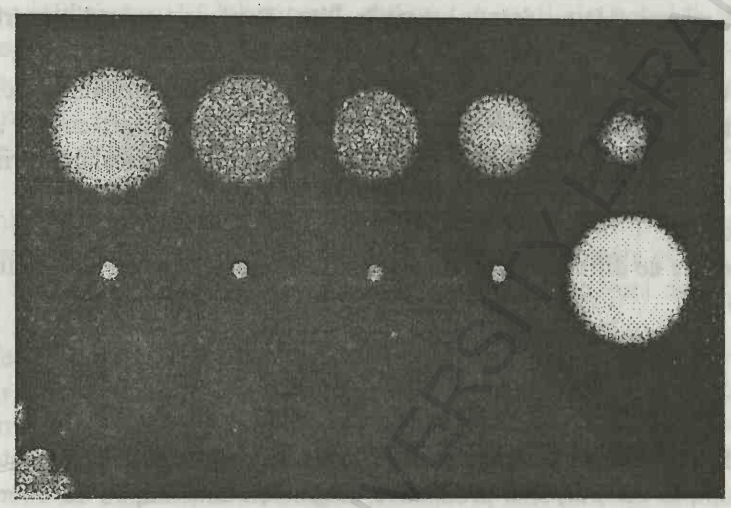


Fig. 15.3. Difuzia radială în gel de agar a subtilizinei NOVO.

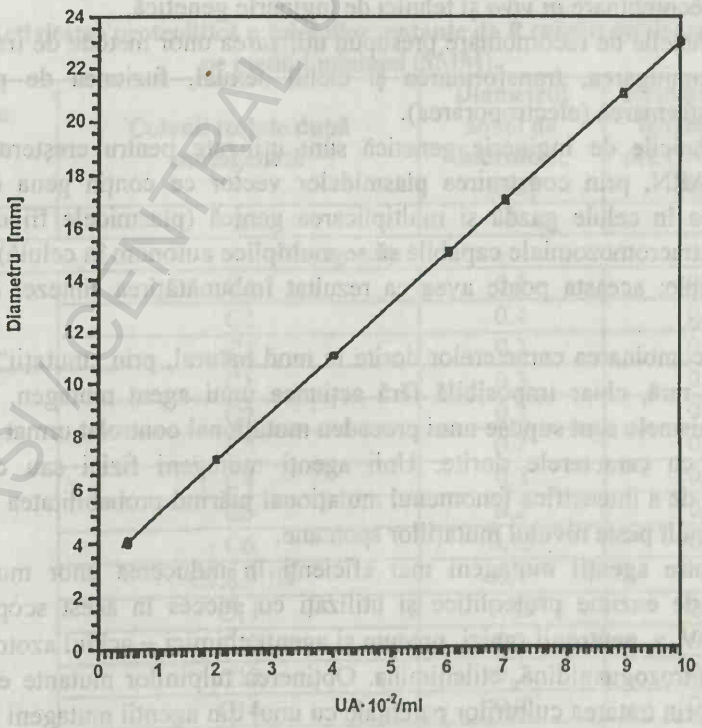


Fig. 15.4. Curba standard de subtilizină NOVO.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITARĂ

În cazul tulpinii *Aspergillus oryzae*, metoda de determinare a activității proteolitice prin difuzie radială utilizată ca metodă de *screening* s-a aplicat în următoarea variantă: mutantele izolate din suspensia de celule iradiate şi dezvoltate pe mediul martor (M) au fost incubate în Plăci Petri pe un mediu nutritiv YPG, conținând 0,1% cazeină în tampon Tris HCl, *p*H = 7,2; după incubare 72 ore la 31°C, în jurul coloniilor însămânțate apar zone de hidroliză vizibile cu ochiul liber. S-a măsurat apoi diametrul zonelor respective şi s-a comparat cu cel al tulpinii parentale a cărei activitate proteazică s-a determinat în prealabil prin metoda Merck. S-a calculat raportul dintre diametrul zonei de hidroliză şi diametrul coloniei R/r.

Zonele de difuzie s-au comparat cu o curbă standard de Subtilizină NOVO (fig. 15.4).

15.6.3. Mutageneza

Microorganismele izolate din diferite surse naturale prin metodele cunoscute sunt, în general, slab productive. Obținerea unor tulpini de interes practic se realizează prin schimbarea structurii lor genetice. Tehnicile utilizate în scopul schimbării structurii genetice a microorganismelor constau în mutații şi selecții, tehnici de recombinare *in vivo* şi tehnici de inginerie genetică.

Tehnicile de recombinare presupun utilizarea unor metode de transformare a ADN: conjugarea, transformarea şi ciclul sexual, fuziunea de protoplaşti, electrotransformarea (electroporarea).

Tehnicile de inginerie genetică sunt utilizate pentru creşterea ratei de sinteză a ARN, prin construirea plasmidelor vector ce conțin gena de interes, introducerea în celule gazdă şi multiplicarea genică (plasmidele fiind elemente genetice extracromozomiale capabile să se multiplice autonom în celulă), realizând copii multiple; aceasta poate avea ca rezultat îmbunătățirea sintezei enzimatice intracelulare.

Recombinarea caracterelor dorite în mod natural, prin „mutații" spontane, este foarte rară, chiar imposibilă fără acțiunea unui agent mutagen. De aceea, microorganismele sunt supuse unui procedeu mutațional controlat urmat de selecția indivizilor cu caracterele dorite. Unii agenți mutageni fizici sau chimici au capacitatea de a intensifica fenomenul mutațional mărind probabilitatea de apariție a acestuia mult peste nivelul mutațiilor spontane.

Dintre agenții mutageni mai eficienți în inducerea unor mutanți înalt productivi de enzime proteolitice şi utilizați cu succes în acest scop amintim: radiațiile UV, γ, neutronii rapizi, precum şi agenți chimici – acidul azotos, nitrozoetilureea, nitrozoguanidina, etilenimina. Obținerea tulpinilor mutante eficiente se realizează prin tratarea culturilor parentale cu unul din agenții mutageni menționați sau prin acțiunea combinată a doi, trei mutageni diferiți. Mutageneza poate fi

realizată, de asemenea, prin tratarea hibrizilor obținuți în fuziunea de protoplaşti, după regenerarea culturii în prezența unor factori mutageni.

Astfel, Michalik şi colab. (1995) au efectuat selecții la *Bacillus licheniformis*, cu acid azotos şi 5-bromuracil, obținând mutanți mai activi în biosinteza de proteaze alcaline de cca 2 ori mai productivi decât tulpina parentală.

De asemenea, Wang, Weimin şi colab. (1987, 1993) au obținut, prin mutageneză cu radiații γ şi nitrozoguanidină, o tulpină mutantă de *Bacillus licheniformis* ce produce o protează alcalină cu 70 % mai activă decât cea obținută din tulpina parentală.

Unii autori au prezentat date privind îmbunătățirea potențialului productiv prin mutageneză la fungi. Astfel, Singh (1980) a obținut mutante pentru proteaze acide prin tratament mutagen cu acid azotos asupra unor tulpini de *Aspergillus niger*.

Efectul mutagen stimulator al N-nitrozo-N-etil-ureei asupra unei tulpini de *Aspergillus oryzae* a fost studiat de Khamidulin şi colab. (1989) care au obținut o creştere a mutanților înalt productivi prin combinarea dozei şoc cu doze prelungite, activitatea proteolitică în culturile selecționate crescând de cca 20 de ori față de tulpina parentală. Se menționează faptul că efectul obținut prin mutageneză, în acest caz, îşi păstrează reproductibilitatea timp de opt generații.

Tabelul 15.3

Activitatea proteolitică a tulpinilor mutante de *B.subtilis* cultivate pe mediul minimal (SMM)

Doza de iradiere, kr	Colonii izolate după mutageneză	Diametrul zonei de hidroliză, [cm]	Activitatea proteolitică la 48 ore fermentație, [UA/l]
1	2	3	4
Mutageneza I			
90	C1	0,3	0,13
	C2	0,4	0,48
	C3	0,3	0,10
120	C1	0,3	0,15
	C2	0,2	0,24
	C3	0,2	0,18
	C4	0,2	0,22
	C5	0,2	0,20
	C6	0,15	0,18
	C7,8,9,10	0,1	–
	C11	0,15	0,18
	C12	0,2	0,24
	C13	0,2	0,27
	C14	0,2	0,19
	C15	0,3	0,39

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ

Tabelul 15.3 (continuare)

1	2	3	4
Mutageneza II			
60	C1,2,3,4,5,7,8,9,10,11,12,13,14	0,15–0,20	–
	C6	0,40	0,78
	C7-22	0,2	0,2
	C23	0,30	0,32
	C24	0,25	0,25
90	C1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13	0,15–0,2	–
	C14	0,25	0,62
	C15,16,17,18,19	0,18–0,20	–
	C20	0,30	0,53
	C21	0,60	–
	C22	0,30	–
	C23,24,25,26,27,28,29	0,18–0,22	–
120	C1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13	0,17–0,20	–
	C14	0,28	0,22
	C15,16,17,18,19,20	0,18–0,20	–
	C21	0,39	0,66
	C22	0,39	0,55
Martor	Tulpina parentală *Bacillus subtilis* IFO 3039	0,18	0,25

La noi în țară menționăm lucrările de mutageneză cu neutroni rapizi, efectuate de colectivul ICCF, asupra unor tulpini de *Bacillus subtilis* producătoare de proteaze neutre și obținerea unui mutant *Bacillus subtilis* ICCF-22a, producător de proteaze active în domeniul de *p*H alcalin [Ioniță A, Jurcoane Șt., 1998] (tabelul 15.3).

Activitatea protezică a tulpinilor mutante de *Bacillus subtilis* obținute în aceste experiențe s-a determinat atât calitativ, prin metoda difuziei radiale în gel de agar 1%, conținând cazeină 0,1% (fig. 15.5), cât și prin determinarea cantitativă a activității enzimatice în lichidul de cultură obținut după cultivarea timp de 48 ore, pe mediu minimal (SMM), a coloniilor izolate prin mutageneză (tabelul 15.3).

În urma studiilor de mutageneză s-a observat apariția unor diferențe între coloniile izolate din suspensia de celule iradiate. Astfel, dacă coloniile care aparțin suspensiei de celule înainte de iradiere prezentau zone de difuzie egale la testul cu cazeină, fapt care dovedește uniformitatea genetică a populației de microorganisme, după mutageneză, au apărut diferențe privind mărimea zonei de hidroliză a substratului. Diametrul zonei de difuzie s-a dovedit a fi proporțional cu activitatea proteolitică la *p*H = 8,5 a coloniilor de *Bacillus subtilis* izolate. Experiențele de mutageneză s-au efectuat în două etape. Dintre coloniile izolate după prima mutageneză – realizată prin iradierea cu o doză de 90 kr – colonia notată C2 a avut un potențial productiv de două ori mai ridicat decât tulpina

parentală. În etapa următoare de mutageneză, pentru iradiere s-a utilizat o suspensie de celule provenită din colonia C2 şi a fost izolată colonia C6 cu un potenţial productiv de trei ori mai ridicat decât tulpina parentală, respectiv 0,78 UA/l faţă de 0,25 UA/l.

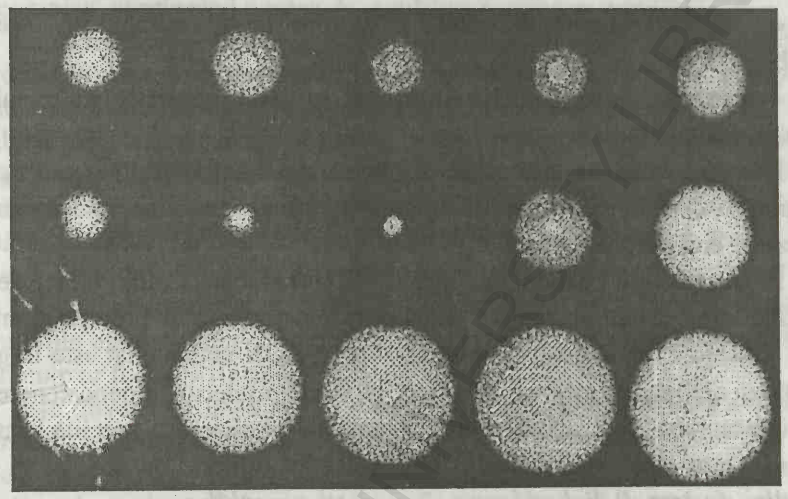


Fig. 15.5. Difuzia radială, la *p*H = 8,5 a proteazelor obţinute prin fermentaţii cu tulpini mutante de *B. subtilis*.

În ceea ce priveşte tulpina de colecţie *B. subtilis* ICCF 22, al cărei potenţial de biosinteză a proteazelor alcaline a fost din start mai ridicat – 3,2 UA/l – aceasta a fost supusă unor proceduri de selecţie naturală în scopul adaptării la *p*H alcalin. Astfel s-au efectuat pasaje succesive în eprubete şi pe plăci Petri care conţineau geloză nutritivă la *p*H alcalin (8–8,5). După incubare, timp de 48 ore, la 37°C s-au izolat coloniile cu diametrul cel mai mare. Adaptarea tulpinii la *p*H alcalin s-a realizat după un număr de 25–30 de treceri succesive. Caracterele morfologice ale culturii respective (cultură în plajă, cu aspect rugos, mat) erau asemănătoare cu ale tulpinii iniţiale cultivată pe geloză nutritivă la *p*H = 6,5 – 7,0. Tulpina adaptată la *p*H alcalin s-a notat *B. subtilis* ICCF 22a. Această tulpină a fost ulterior utilizată în experienţele de selecţie naturală pentru izolarea de colonii tipice rugoase „R", cu aderenţă la substrat şi cu productivitate mare.

15.6.4. Fuziunea de protoplaşti

Fuziunea de protoplaşti este o tehnică de mare importanţă pentru biotehnologie. Ea permite reunirea într-o singură celulă a două sau mai multe genomuri diferite şi complete. Protoplastul reprezintă ansamblul structurilor celulare rămase dintr-o bacterie după îndepărtarea integrală a peretelui celular.

Fuziunea de protoplaşti cuprinde următoarele etape:

– îndepărtarea peretelui celular şi obţinerea protoplaştilor, care se realizează în general cu lizozim;

– fuziunea protoplaştilor în prezenţa substanţelor stimulatoare: PEG şi $CaCl_2$;

– regenerarea peretelui celular cu ajutorul agenţilor stabilizanţi (gelatină, serumalbumină etc.);

– reversia, prin care se formează o nouă generaţie de celule din protoplaştii fuzionaţi.

Fuziunea de protoplaşti poate fi aplicată atât bacteriilor din genul *Bacillus*, cât şi fungilor filamentoşi din genul *Aspergillus,* pentru creşterea randamentului în biosinteza de enzime proteolitice.

În prezent s-au pus la punct metode de introducere a moleculelor de ADN recombinat într-o celulă bacteriană gazdă prin transformare de protoplaşti mediată de PEG. Eficienţa transformării protoplaştilor cu ADN recombinat este în general de 1–10% şi are marele avantaj că se pot folosi atât molecule monocatenare cât şi molecule bicatenare de ADN. Metoda este aplicată cu succes la speciile bacteriene la care se obţin rapid protoplaşti stabili în mediu osmotic, în special la bacili: *B. amiloliquefaciens, B. licheniformis, B. stearothermophilus.*

Protoplaştii de *Bacillus subtilis* pot fi transformaţi cu ADN plasmidial. În literatura de specialitate s-a menţionat o eficienţă de 50–80 % a celulelor regenerate. Metoda de obţinere a protoplaştilor la *B. subtilis* a fost pusă la punct de Chang şi Cohen [Chang şi Cohen, 1979].

În mod cert transformarea de protoplaşti are avantaje, dar şi dezavantaje. Dintre avantaje amintim aplicarea la o mare varietate de specii de *Bacillus.*

Dintre dezavantajele acestei tehnici menţionăm faptul că protoplaştii sunt fragili şi se sparg repede chiar în medii stabilizate osmotic, iar regenerarea se desfăşoară uneori cu eficienţă scăzută (circa 10% din celulele protoplastizate) şi necesită un timp lung pentru regenerare. Metodele necesită medii complete, sunt laborioase şi rezultatele se reproduc greu.

15.6.5. Metode de inginerie genetică

Mărirea gradului de eficacitate a tehnologiilor de biosinteză a enzimelor se realizează astăzi pe scară largă prin utilizarea tehnicilor de recombinare genetică în lucrările de îmbunătăţire a potenţialului productiv al tulpinilor implicate în proces.

Mecanismul de reglare a biosintezei proteazelor la tulpini de *B. subtilis*. Obţinerea de tulpini de interes bioproductiv, prin metodele ingineriei genetice, prezintă un interes deosebit în domeniul biotehnologiei. Majoritatea suşelor producătoare astfel obţinute constituie elementul esenţial al rentabilităţii tehnologiilor

de biosinteză. O problemă de interes major o constituie obținerea de tulpini bacteriene înalt producătoare de enzime.

Există o literatură de specialitate bogată referitoare la structura genetică a microorganismelor aparținând speciei *B. subtilis* și la mecanismul de producere a proteazelor. Astfel, producerea de proteaze extracelulare de către *B. subtilis* este un proces complex, cuprinzând o rețea de regulatori pozitivi și negativi.

Copii multiple ale genelor *deg* R, *deg* Q, *sen* S și *ten* A sunt implicate în superproducția proteazelor extracelulare. Pe de altă parte, locusurile *abr* B, *hpr*, *sin* și *pai* sunt implicate în reglarea negativă, astfel încât produșii în exces ai acestor gene inhibă producția de exoproteaze. În această rețea de reglare complexă, sistemul *deg* S – *deg* U joacă un rol central. În același timp, senzorul de tip kinasă, *deg* S acceptă stimuli din mediul înconjurător, își autofosforilează propriul rest de histidină și transferă fosfatul de la restul de aspartat regulatorului înrudit *deg* U. Gena *deg* S este implicată în defosforilarea *deg* U fosforilate.

Este deja demonstrat că forma fosforilată a genei *deg* U este stabilizată de copii multiple ale genei *deg* R sau de mutații ce cauzează hiperproducția exoproteazelor, cum ar fi *deg* S 100, *deg* S 200, *deg* U 32 și *deg* U9.

Este dovedit că gena *pro* B mărește producerea de proteaze acționând în mod sinergic cu copii multiple ale genei *deg* R și că efectul genei *pro* B este dependent de gena *deg* S. Este posibil ca glutamyl-fosfatul care este un compus intermediar al genei *pro* B în timpul biosintezei prolinei să servească drept donor de grupare fosfat cu greutate moleculară mică pentru sistemul bicomponent *deg* S – *deg* U.

Pentru clonarea genei răspunzătoare de producția de proteaze s-a pus la punct o metodă de clonare tip țintă a ADN de *B. subtilis* în celule purtătoare de plasmida pNC 61 (care conține gena *deg* R) cu ajutorul vectorului pNC 6. Tulpinile bacteriene și plasmidele utilizate de diferiți autori sunt redate în tabelul 15.4.

Tabelul 15.4

Tulpini bacteriene și plasmide utilizate în lucrări de clonare în *B. subtilis* (după M. Ogura, M. Kawata ș.a., 1994)

Tulpină sau plasmidă	Descrierea genotipului
Tulpini de *B.subtilis* MI 112	arg 15, leu B8, thr 5 rec E 4 hsm M, hsr M
DB 104	his npr R2, npr E18 Δ apr E3
MT 33	his npr R2, npr E18 apr E' – lac Z
CU 741	trp C 2 leu C 7
Tulpini *E.coli* JM 109	recA 1 Δ (lac-pro AB) end A1 gyr A96 thi-1, has R17 rel A1 sup E 44
Plasmide pNC 6	Trimetoprim rezistentă
pNC 61	pNC 6 purtând gena *deg* R
pUBH 1	Kanamycin rezistentă
pLC 1	pUBH 1 purtând gena *pro* B

Tehnica de lucru a fost următoarea: ADN total din tulpina *B.subtilis* cu 741 şi vectorul ce conţine gena de rezistenţă la kanamicină pUBH 1 au fost fragmentate cu EcoR I, legate şi apoi transformate în celule MI 112 purtătoare de pNC 61 prin transformare de protoplaşti. Transformanţii rezistenţi la kanamicină şi trimethoprim au fost selecţionaţi pentru producerea de exoproteaze după mărimea haloului pe mediu solid. Dintre cei 2500 transformanţi, o colonie a arătat un halou extrem de mare comparativ cu cel al celulelor purtătoare de pNC 61 şi pUBH 1. Plasmida din acest transformant a fost denumită pLC 1. A fost studiat, de asemenea, şi efectul sinergic al pLC 1 cu plasmida pNC 61 purtând gena *deg* R. Celulele purtătoare a diferiţi derivaţi ai pNC 61 s-au examinat pe plăci de agar LBCG (mediu Luria-Bertani conţinând cazeină şi gelatină) (fig. 15.6). Gena *deg* R intactă este purtată pe pNC 61 ΔH 8 şi pNC 61 ΔR 5, în timp ce ea lipseşte în pNC 61 ΔV 10. S-a demonstrat că celulele purtătoare a pLC 1 plus pNC 61 ΔH 8 şi acelea care posedă pLC 1 plus pNC 61 ΔR 5 produc un halou la fel de mare ca cel observat la celulele purtând pLC 1 şi pNC 61. În schimb, celulele purtătoare de pLC 1 şi pNC 61 ΔV 10 au un halou similar cu cel observat pentru celulele purtătoare de pLC 1 şi pNC 6. Pe baza acestor date s-a tras concluzia că efectul sinergic al pLC 1 depinde de gena *deg* R.

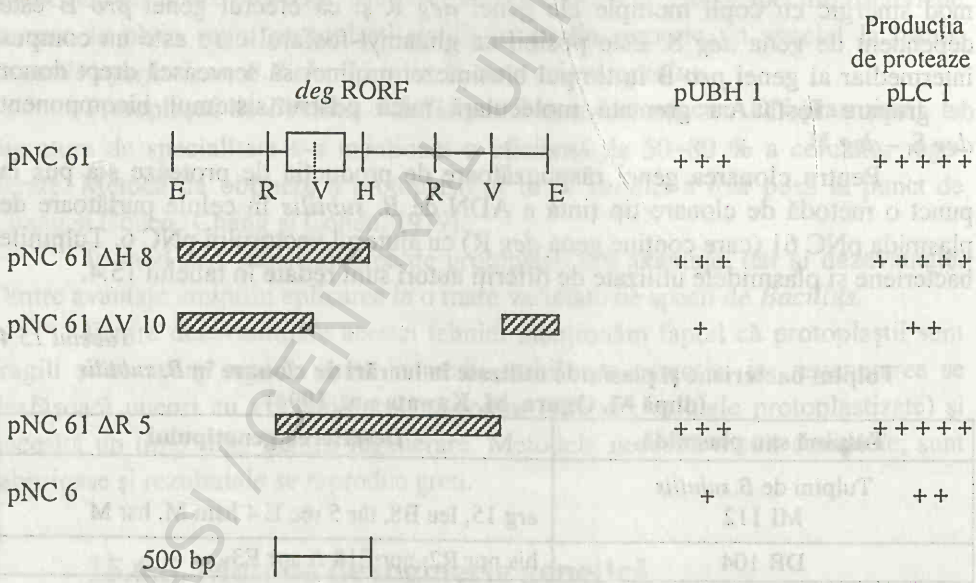


Fig. 15.6. Determinarea regiunii ADN din pNC 61 necesară pentru efectul sinergic cu pLC 1. Este redată harta de restricţie a fragmentului de 1,6 kb inserat în pNC 61: dreptunghiul nehaşurat reprezintă gena *deg* R; dreptunghiurile haşurate reprezintă regiuni din ADN ale pNC 61 rămase în plasmide; s-a măsurat mărimea haloului produs de celulele MI 112 purtătoare fie de pLC 1 fie de pUBH 1 împreună cu pNC 61 sau cu derivaţi ai acestora şi s-a notat cu +.

+ 9,0 mm; ++ 9,0-10,5 mm; +++ 10,5-12,0 mm; +++++ 15,0 mm

Abrevieri E, Eco RI, H, Hind III, R, Rsa I, V, EcoRV.

Sinergismul s-a observat numai când *deg* R a fost prezent în multe copii ale plasmidei, deoarece mărirea cantității de proteaze a avut loc indiferent dacă *deg* R cromozomal a fost intact sau fragmentat (rupt). Gena *deg* R dintr-un ADN cromozomal fragmentat nu a avut efect asupra producției de proteaze, ceea ce arată că sinergismul depinde numai de cantitatea de *deg* R prezentă în celulă.

Pentru a stabili dacă pLC 1 își exercită, de asemenea, efectul sinergic și asupra unui alt regulator pozitiv *deg* Q, s-a construit plasmida pNQ 602, în care gena *deg* Q, purtată pe un fragment de 2,9 kb inserat în pBQ 1, s-a transferat pe un vector ce conține gena de rezistență la trimethoprim și introdus în celulele MI 33. În acest caz, nu s-a găsit un efect sinergic al pLC 1 cu pNQ 602. Aceasta sugerează faptul că efectul sinergic al pLC 1 este specific pentru *deg* R. S-a tras concluzia că pLC 1 cooperează cu pNC 61 în producția de exoproteaze.

Același studiu la care ne referim a determinat secvența genei responsabile de efectul stimulator asupra producerii de exoproteaze.

Astfel, s-a stabilit harta fizică a ADN inserat în pLC 1 și a diferitelor derivate construite așa cum se poate urmări în figura 15.7.

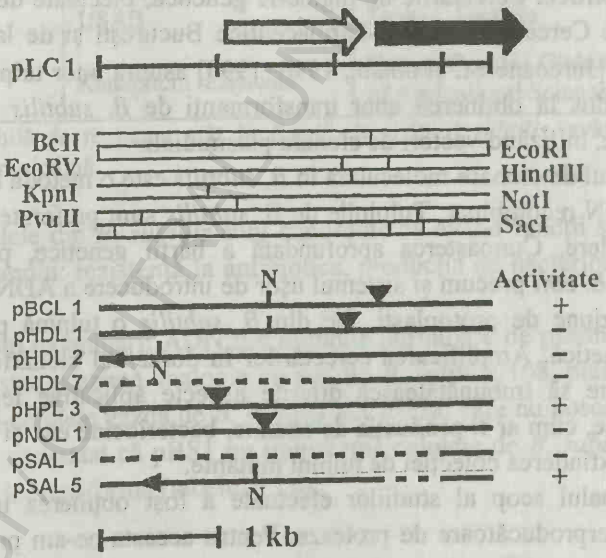


Fig. 15.7. Harta de restricție a fragmentului de 3,5 kb inserat în pLC 1 și structura diferitelor plasmide derivate de la pLC 1:
linia punctată din pHDL 7, pSAL 4 și pSAL 5 indică segmentele de restricție obținute cu Not I din pLC 1, iar săgețile indică inversia fragmentelor de AND în plasmida corespunzătoare. În pHDL 2 este evidențiată prezența unei secvențe de 29 nucleotide provenită de la un alt vector; triunghiurile de culoare închisă indică poziția mutațiilor introduse iar + și – indică prezența sau absența efectului de mărire a producției de exoproteaze determinate prin mărimea haloului celulelor purtând pNC 61; plus și minus corespund la notațiile +++++ și, respectiv, +++ din fig. 15.6.

Producția de exoproteaze de către tulpina *B. subtilis* MI 112 ce conține plasmida pNC 61 şi una dintre plasmidele construite (fig. 15.7) a fost determinată prin examinarea mărimii haloului de degradare a proteinelor pe mediu LBC 6. Mutațiile variate introduse în pLC 1 având ca rezultat obținerea plasmidelor: pBCL 1 (mutație la nivelul situsului unic Bcl 1 din pLC 1), pKPL 3 (mutație la nivelul situsului unic Kpn I) nu influențează nivelul exoproteazelor produse de tulpina purtătoare. În schimb, mutațiile induse la nivelul situsurilor unice *Not* I (pNOL 1) şi *Hind* III (pHOL 1) au inhibat producerea de proteaze. Plasmida pSAL 5 care conține un fragment *Sac* I de 2,5 kb menține activitatea enzimatică a tulpinii purtătoare.

De asemenea, inversia sau deleția fragmentului *Hind* III (pHOL 2 şi respectiv pHOL 7) sau deleția celor 2 fragmente *Sac* I (pSAL 4) din plasmida pLC 1 conduc la pierderea activității enzimatice.

Aceste rezultate arată că regiunea Kpn I – Bcl I de 1,4 kb este responsabilă de mărirea activității enzimatice.

Aplicații ale ingineriei genetice în obținerea de tulpini producătoare de enzime proteolitice. Cercetările de inginerie genetică, efectuate de colectivele de la Institutul de Cercetări Chimico-Farmaceutice Bucureşti şi de la Facultatea de Biotehnologie [Jurcoane Şt. şi colab., 1996–1999] asupra unor tulpini din colecția ICCF, au condus la obținerea unor transformanți de *B. subtilis* producători de proteaze neutre, utilizând vectori de clonare plasmidiali.

Sistemul de clonare moleculară în *B. subtilis* este o metodă bine stabilită în studiile de ADN recombinat. Tulpinile de *B. subtilis* sunt preferate din mai multe puncte de vedere. Cunoaşterea aprofundată a hărții genetice, posibilitățile de comparație cu *E. coli* precum şi sistemul uşor de introducere a ADN-ului în celula-gazdă prin fuziune de protoplaşti, fac din *B. subtilis* o tulpină potrivită pentru studiile de genetică. Amplificarea cercetărilor în domeniul clonării moleculare la *B. subtilis* poate să îmbunătățească diferite aspecte aplicative legate de aceste microorganisme, cum ar fi producția de enzime, bacteriocine etc. şi în acelaşi timp face posibilă extinderea colecției de tulpini mutante.

Principalul scop al studiilor efectuate a fost obținerea unor tulpini de *B. subtilis*, hiperproducătoare de proteaze. Pentru aceasta ne-am propus obținerea unei plasmide, capabilă să conțină în structura ei secvențe din gena *pro* B (responsabile de mărirea producției de protează) şi apoi obținerea prin transformare a unor celule conținând mai multe copii ale genei *pro* B. Au fost studiate mai multe tipuri de plasmide conținute fie de tulpini de *E. coli*, fie de *B. subtilis* (tabelul 15.5), în vederea alegerii variantei optime pentru transformare genetică la bacili. O parte din plasmidele utilizate au provenit din laboratorul dr. Zoltan Pragai, de la Universitatea de Ştiințe Agricole din Gödöllo, Ungaria.

Tulpinile bacteriene şi plasmidele utilizate sunt cuprinse în tabelul 15.5.

Tabelul 15.5

Tulpini bacteriene şi plasmide utilizate în experienţele de modificare genetică a tulpinilor de *B. subtilis*

Tulpina sau plasmida	Genotip/descriere	Proveniență
Tulpini		
E.coli ATCC 9637	$Trim^r$	ICCF
E.coli USAB 573	$Trim^r$	USAB Timişoara
B.subtilis ICCF 22 a		ICCF
B.subtilis USAB	$Trim^r$, Amp^r	USAB Timişoara
Plasmide		
pEC_1	Timethoprim rezistentă, derivată din *E. coli* ATCC	Obţinută şi caracterizată în laboratoarele Biological Research Center, Szeged, Ungaria
pBS_1	Ampicilin rezistentă derivată din *B. subtilis* USAB	Obţinută şi caracterizată în laboratoarele Biological Research Center, Szeged, Ungaria
$pUBC_{18}$*	Kanamicin rezistentă	Zoltan Pragai, Gödöllo, University of Agricultural Sciences, Ungaria

* Plasmidă capabilă de replicare atât în *E.coli* cât şi în *B. subtilis*, având rezistenţă la kanamicină şi ampicilină.

Plasmidele din *B. subtilis* sunt cunoscute ca având funcţii specifice determinând, de exemplu: rezistenţă la antibiotice, producţia de bacteriocine, producţia de enzime etc.

În scopul examinării ADN din tulpinile purtătoare de plasmide şi pentru a vedea dacă acestea prezintă analogie cu cel din *B. subtilis* 168, plasmidele izolate s-au introdus în celulele gazdă de *B. subtilis* ICCF 22a, care nu posedă rezistenţă la antibiotice. S-a constatat că pBS1 nu transformă celulele de *B. subtilis* ICCF 22a, dar pUBUC 18 le transformă (tabelul 15.6).

Tabelul 15.6

Transformarea tulpinii de *B. subtilis* ICCF 22a cu ADN plasmidial

Plasmidă	Proveniență	Celulă-gazdă	Marker de selecţie	Nr. transformanţi [ml]
pEC_1	*E. coli*	*B. subtilis* ICCF 22a	Trim	$2{,}3 \cdot 10^4$
pBS_1	*B. subtilis*	*B. subtilis* ICCF 22a	Amp	10
pUBUC 18	Recombinant *B.subtilis* şi *E.coli*	*B. subtilis* ICCF 22a	Km	$6{,}1 \cdot 10^6$

Pentru examinarea efectului plasmidelor introduse în celulele de *B. subtilis*, bacteriile au fost cultivate pe plăci cu mediu LBCG conținând cazeină și antibioticele corespunzătoare. Efectul sinergic s-a determinat pe baza dimensiunilor haloului generat după 24 de ore. Concentrațiile antibioticelor adăugate în mediu au fost de 10 μg/ml pentru trimethoprim și kanamicină și 50 μg/ml pentru ampicilină.

Procesul de transformare s-a efectuat prin fuziune de protoplaști în polietilenglicol prin metoda indicată de Chang și Cohen [Chang și Cohen, 1979]. Celulele transformate au fost selectate pe medii conținând kanamicină și trimethoprim.

Plasmidele pUBUC 18 și pEC_1, având dimensiunea de 7,23 kb și respectiv 4,507 kb, au indus caracterul de rezistență la antibiotice prin introducerea în celule gazdă de *B. subtilis* ICCF 22a, astfel încât acestea pot fi utilizate la obținerea vectorilor de clonare recombinanți pentru *B. subtilis*.

În vederea obținerii unor vectori de clonare plasmidiali, recombinanți pentru *B. subtilis*, a fost necesară amplificarea și izolarea genelor *pro* A și *pro* B răspunzătoare de creșterea producției de proteaze extracelulare la *B. subtilis*.

În scopul selecționării genei *pro* B și legării acesteia de vectorul pUBUC 18 s-a procedat la amplificarea secvenței de nucleotide din genomul unor tulpini de *B. subtilis* producătoare de proteaze. Capacitatea de producere a proteazelor neutre și alcaline a acestor tulpini s-a verificat pe plăci Petri cu mediu LBCG.

În vederea amplificării genei de interes, s-a procedat la extracția și purificarea ADN cromozomal.

Pentru inițierea reacției de polimerizare, s-a studiat secvența de nucleotide a genei pro B și s-au ales pentru amplificare 2 „primeri" cu 30 nucleotide și respectiv 27 nucleotide, cu următoarea secvență:

Primer 1: (5') TAG TCG ACG GTA CCA CGG AAA CCC ATT TGC
Primer 2: (5') ATG GAT CCG CGG TAA ATA ATG GCT GAC.

Tulpinile bacteriene utilizate pentru extracția ADN cromozomal sunt cuprinse în tabelul 15.7.

Tabelul 15.7

Tulpini bacteriene utilizate pentru extracția ADN cromozomal

Tulpini	Caracteristici	Proveniență
B. subtilis Marburg (B52)	Sm, Km, Cm, Amp	USAMV-București Facultatea de Biotehnologii
B. subtilis ICCF-22	Amp	ICCF-București
B. subtilis USAB	Amp, Trim	USAMVB-Timișoara, Facultatea de Zootehnie și Biotehnologii
B. subtilis 31	Sm	USAMV-București Facultatea de Biotehnologii
B. subtilis B.34	Cm, Km	USAMV-București Facultatea de Biotehnologii

ADN-cromozomal utilizat la amplificarea genelor *pro* A şi *pro* B s-a izolat şi s-a purificat din tulpinile cuprinse în tabelul 15.7, aplicând metoda tratării cu fenol descrisă de Saito şi Miura [Saito şi Miura, 1963].

Fragmentele de ADN conţinând genele *pro* A şi *pro* B au fost izolate şi purificate prin secţionarea gelului de agaroză conţinând produsul după amplificare şi purificat cu ajutorul kit-ului QIAEX DNA.

Produsul amplificat obţinut poate fi utilizat la inserţia genelor *pro* A, *pro* B în plasmide folosite ca vectori de clonare în *B. subtilis*.

15.7. BIOSINTEZA PROTEAZELOR BACTERIENE ÎN SISTEM SUBMERS

Utilizarea pe scară largă a proteazelor microbiene a determinat creşterea progresivă a interesului oamenilor de ştiinţă faţă de aceste enzime. Numeroasele cercetări au condus la obţinerea acestor enzime în stare de puritate avansată, stabilirea parametrilor optimi de activitate şi stabilitate, precizarea mecanismelor lor de acţiune şi, în ultimele decenii, la stabilirea structurii lor.

O serie de proteaze, cu precădere cele de origine bacteriană sau fungică, sunt obţinute şi comercializate ca preparate enzimatice utilizate în diferite sectoare ale industriei alimentare, farmaceutice, la obţinerea detergenţilor cu enzime, în scopuri analitice etc. Aria largă de utilizare practică este determinată de avantajele pe care le oferă acest tip de preparate, respectiv viteze ridicate de cataliză, specificitate, acţiune în condiţii de *p*H, temperatură, presiune etc. aproape normale.

Toate acestea şi în special faptul că proteazele microbiene se utilizează în industria detergenţilor enzimatici au determinat producerea acestor enzime în cantităţi industriale, având la ora actuală cea mai mare piaţă de desfacere.

La noi în ţară s-a stabilit o tehnologie de obţinere a proteazelor utilizate în compoziţia detergenţilor pornind de la o tulpină selecţionată prin mutageneză, în cadrul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice Bucureşti.

Cultivarea tulpinii *Bacillus subtilis ICCF-22a*, selecţionate, s-a realizat în condiţii submerse, în bioreactoare de diferite capacităţi (10–100 l). Productivitatea bioprocesului a fost mărită şi prin alegerea celor mai bune condiţii de cultivare – respectiv mediul de cultură, etapa de dezvoltare, parametrii de biosinteză, atât pentru faza de laborator cât şi în condiţii pilot.

15.7.1. Medii de cultură

Mediile utilizate pentru obținerea preparatelor enzimatice de origine microbiană sunt fie *medii sintetice* – conținând surse standardizate de carbon, azot și săruri minerale – fie *medii naturale* – conținând ca surse de carbon și azot, subproduse ale industriei agroalimentare – șrot de soia, tărâțe de grâu, făină de porumb, extract de porumb, melasă, hidrolizate cu conținut în glucoză. Avantajele utilizării acestor subproduse constau în prețul de cost scăzut, disponibilitatea și compoziția complexă – carbon, azot, vitamine, aminoacizi, minerale. Pornind de la aceste considerente, în biosinteza proteazelor microbiene pot fi utilizate mai multe formule de mediu nutritiv, care sunt prezentate în cele ce urmează.

Pentru cultivarea tulpinilor de *Bacillus subtilis*:

- *mediu cu geloză simplă*:
  - peptonă 1 g %
  - extract de carne 0,3 g %
  - NaCl 0,5 g %
  - agar-agar 2 g %
- *mediu minimal* (*Subtilis minimal medium*) (*SMM*)
  - glucoză 0,5 g %
  - hidrolizat de caseină 0,02 g %
  - $(NH_4)_2SO_4$ 0,2 g %
  - K_2HPO_4 1,4 g %
  - KH_2PO_4 0,6 g %
  - citrat de sodiu.$2H_2O$ 0,1 g %
  - $MgSO_4.7H_2O$ 0,02 g %
- *mediu cu lactoză*: (*semisintetic*) (*SS*)
  - lactoză 2 g %
  - Bacto-peptonă Difco 1 g %
  - NaCl 0,15 g %
  - $MgSO_4.7H_2O$ 0,015 g %
  - $CaCl_2$ 0,006 g%
  - K_2HPO_4 0,15 g %
  - KH_2PO_4 0,15 g %
  - Na_2SO_4 0,15 g %
  - $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,001 g %

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- *mediu cu glucoză* (*G*):
  - glucoză 1 g %
  - amidon solubil 5 g %
  - făină de soia 1 g %
  - $(NH_4)_2HPO_4$ 0,5 g %
  - $MgSO_4.7H_2O$ 0,05 g %
- *mediu cu hidrolizat acid de mălai 1 %* (H1)*
  - hidrolizat acid de mălai 1 g %
  - făină de soia 1 g %
  - $(NH_4)_2HPO_4$ 0,5 g %
  - $MgSO_4.7H_2O$ 0,05 g %
- *mediu cu hidrolizat acid de mălai 2 %* (H2)*
- *mediu cu hidrolizat acid de mălai 3 %* (H3)*
- *mediu cu hidrolizat acid de mălai 4 %* (H4)*
- *mediu cu şrot de soia 1 %* (MS-1):
  - făină de porumb 2 g %
  - şrot de soia 1 g %
  - $(NH_4)_2HPO_4$ 0,5 g %
  - $MgSO_4*7H_2O$ 0,05 g %
- *mediu cu şrot de soia 2 %* (MS-2)**
- *mediu cu şrot de soia 3 %* (MS-3)**

Sterilizarea mediilor menţionate este dependentă de compoziţie; prin urmare, mediile cu glucoză şi hidrolizat acid de mălai se sterilizează timp de 10 min la 105°C, iar celelalte 20 min la 110°C.

Criteriul de selecţie al formulei optime de mediu este, în general, nivelul maxim de activitate enzimatică prezentă în culturile microbiene cultivate pe mediile respective.

De exemplu, pentru tulpina *Bacillus subtilis ICCF-22a,* cele mai bune rezultate s-au obţinut prin cultivare pe mediul nutritiv MS-2, care conţine şrot de soia 2% (tabelul 15.8).

---

* Mediile H2, H3, H4 conţin şi făină de soia, $(NH_4)_2HPO_4$, $MgSO_4.7H_2O$ în proporţia indicată pentru mediul H1.

** Mediile MS-2 şi MS-3 conţin şi făină de porumb, $(NH_4)_2HPO_4$, $MgSO_4.7H_2O$ în proporţia indicată pentru mediul MS-1.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 15.8

Activitatea proteolitică a tulpinilor *Bacillus subtilis* ICCF 22a şi *Bacillus subtilis* IFO – 3039 – C_6 cultivate pe diferite medii nutritive, în laborator şi pilot

Tulpina	Varianta de mediu nutritiv	Activitatea proteolitică la *p*H = 8,5 [UA/l]		Condiţii de cultivare în faza pilot
		Faza laborator	Faza pilot	
	G (cu glucoză)	3,0	–	–
	H_1 (cu hidrolizat de mălai 1%)	0,8	–	–
Bacillus subtilis ICCF 22a	H_2 (cu hidrolizat de mălai 2%)	1,0	2,0	Temperatură: 37°C Agitare 340 rot/min Debit de aer: 1,5 l/min Presiune 0,5 bar Durata: 48 ore
	H_3 (cu hidrolizat de mălai 3%)	1,2	–	–
	H_4 (cu hidrolizat de mălai 4%)	1,8	–	–
	MS-1 (cu şrot de soia 1%)	3,0	–	–
	MS-2 (cu şrot de soia 2%)	4,0	7,0	Temperatură: 37°C Agitare 340 rot/min Debit de aer: 1,5 l/min Presiune 0,5 bar Durata: 48 ore
	MS-3 (cu şrot de soia 3%)	3,2	–	–
Bacillus subtilis IFO –3039- C_6	MS-2 (cu şrot de soia 2%)	1,0	–	–

Prelucrarea culturilor de *Bacillus subtilis* cultivate pe mediile menţionate s-a efectuat prin separarea biomasei bacteriene prin centrifugare 10 min la 4000 rot/min şi reţinerea supernatantului reprezentând lichidul de cultură extracelular în care s-a determinat ulterior activitatea proteolitică.

15.7.2. Parametrii de cultivare

Procedeul de cultivare submers este cel mai mult folosit în biosinteza proteazelor cu tulpini de *B. subtilis*. Acest procedeu necesită instalaţii care permit o amestecare perfectă a componentelor solide, lichide şi gazoase ale mediului de

biosinteză, o alimentare adecvată cu aer, fiind echipate cu aparatură de măsură şi control (AMC).

Alţi factori importanţi pentru procesul de biosinteză enzimatică sunt: fiziologia producătorilor, formula de mediu nutritiv şi condiţiile de cultivare.

Dintre substanţele care intră în compoziţia mediului nutritiv acţiunea cea mai eficace asupra sintezei proteazelor o manifestă glucidele. Acestea pot fi folosite atât sub formă de polizaharide (amidon) cât şi ca monozaharide. Concentraţia amidonului şi a produselor de hidroliză din mediu poate varia de la 0,1 la 15%, în funcţie de specia microorganismului.

În ceea ce priveşte sursa de azot, pentru cultivarea tulpinilor producătoare de proteaze se folosesc curent azotul din proteine şi produsele lor de hidroliză – peptide şi aminoacizi. Astfel, făina de soia, şrotul de soia, extractul de porumb se folosesc în mod curent în producţia de proteaze cu *B. subtilis*. O serie de autori au stabilit că introducerea în mediu a aminoacizilor favorizează dezvoltarea microorganismelor şi induce biosinteza proteazelor. Astfel, efectul cel mai puternic inductiv îl posedă leucina, pe când asparagina reprimă complet biosinteza, iar arginina, serina, prolina induc parţial sinteza enzimei.

Acţiune stimulatoare asupra sintezei proteazelor de către tulpina *B. subtilis* o au şi vitaminele (tiamină, biotină, acid folic, nicotinamidă).

Pe lângă sursele de carbon, azot, aminoacizi, vitamine şi microelementele, cum ar fi Ca, P, Mn, Fe, K, Mg, introduse în mediu sub formă de săruri în diferite concentraţii pot influenţa biosinteza proteazelor. Astfel, calciul joacă rol de tampon şi stabilizează enzimele proteolitice la temperaturi ridicate. Se presupune că ionii de calciu favorizează şi sinteza enzimelor proteolitice alcaline, înlesnesc eliminarea acestora din celule şi joacă un rol important în formarea sporilor.

În afara compoziţiei mediului nutritiv un rol important îl joacă şi condiţiile de cultivare a microorganismelor: *p*H-ul, temperatura, aeraţia şi proporţia materialului de însămânţare. Condiţiile acestea sunt strict specifice fiecărui microorganism, iar studiul lor permite dirijarea biosintezei enzimelor proteolitice.

***p*H-ul mediului.** Poate influenţa procesele metabolice, sinteza şi acumularea diferitelor enzime. Producătorii de proteaze neutre şi alcaline se dezvoltă bine la valori neutre şi slab alcaline de *p*H, apropiate de 7. Astfel, la cultivarea tulpinilor de *Bacillus subtilis*, *p*H-ul mediului în procesul de fermentaţie se menţine la nivelul 6 – 6,5.

Temperatura de cultivare. Aceasta s-a dovedit foarte importantă pentru creşterea şi dezvoltarea microorganismelor şi pentru biosinteza enzimelor. Temperatura favorabilă creşterii s-a dovedit în majoritatea cazurilor optimă şi pentru sinteza enzimelor. Pentru bacteriile mezofile, temperatura variază între 35 şi 40°C, iar pentru cele termofile între 45 şi 60°C. Tulpinile de *Bacillus subtilis* sunt mezofile.

Aeraţia. Concentraţia oxigenului dizolvat în mediu este un factor important, influenţând viteza şi nivelul sintezei proteazelor la bacteriile aerobe. Pentru o sinteză maximă a enzimelor proteolitice de către bacterii este nevoie de o aeraţie intensă. Necesarul de oxigen se creşte la începutul sporulării bacililor, din care cauză în această perioadă se măreşte cantitatea de aer admisă în mediu. Regimul optim de aeraţie pentru fiecare microorganism se stabileşte experimental. La mărirea aeraţiei, durata dezvoltării se poate scurta de 1,5 ori. La unele microorganisme sinteza maximă de enzimă are loc la un debit minim de 1,5 l aer/l mediu şi turaţia agitatorului 400 rot/min.

Fungii aparţinând genului *Aspergillus oryzae* sunt cunoscuţi prin capacitatea lor de a produce un amestec de proteaze, fie acide şi neutre, fie neutre şi alcaline, în funcţie de condiţiile de cultivare.

Proteazele produse de fungi sunt atât intracelulare, cât şi extracelulare. Microorganismele respective pot fi cultivate atât în culturi de suprafaţă, cât şi în culturi submerse. În ambele cazuri se utilizează, în general, tulpini mutante selecţionate, cu potenţial de biosinteză al proteazelor crescut faţă de tulpinile sălbatice.

Compoziţia mediului de cultură, necesităţile nutriţionale precum şi parametrii de biosinteză se stabilesc pentru fiecare microorganism în parte.

Inducerea sintezei enzimelor proteolitice în culturi de microorganisme este determinată nu numai de compoziţia mediului nutritiv, ci şi de parametrii tehnologiei de cultivare (*p*H-ul mediului, temperatură, conţinutul oxigenului dizolvat în mediu, calitatea şi cantitatea materialului biologic). *p*H-ul mediului de cultură poate schimba direcţia proceselor metabolice, sinteza şi acumularea enzimelor în culturi de microorganisme. Producătorii de proteaze neutre se dezvoltă optim la valori neutre de *p*H, apropiate de 7,0, în timp ce, pentru biosinteza proteazelor alcaline, microorganismele (mai frecvent bacterii) se cultivă la *p*H = 9,0–11,0, în funcţie de particularităţile fiziologice ale tulpinilor. Fungii şi unele levuri care produc proteaze acide se cultivă la *p*H = 3,5–5.

În timpul bioprocesului, *p*H-ul mediului are tendinţa de scădere, motiv pentru care se face tamponarea mediului cu tampon fosfat sau TRIS, iar în condiţii industriale, *p*H-ul mediului se reglează prin adăugare de amoniac sau hidroxid de sodiu (soluţie).

Sinteza proteazelor are loc într-un domeniu îngust de *p*H şi de aceea are importanţă durata menţinerii acestuia la un nivel determinat. Temperatura de cultivare influenţează atât multiplicarea microorganismelor cât şi sinteza enzimatică.

Biosinteza proteazelor neutre şi alcaline în culturi bacteriene de *Bacillus cereus, Bacillus licheniformis* şi *Bacillus subtilis* se realizează prin cultivarea producătorilor la 35...38°C, timp de 48–72 de ore.

Pentru producerea enzimelor proteolitice în culturi submerse de microorganisme se utilizează bioreactoare cu un volum de 20–200 m^3. Procesele aerobe microbiene necesită un continuu transfer al oxigenului dizolvat în mediul de cultură. Problemele concomitente ale transferului de masă şi energie sunt, de obicei, neglijate în fermentatoarele de capacitate mică şi cu densităţi joase ale celulelor microbiene, însă în procesele de microbiologie industrială care utilizează bioreactoare, cu volumele menţionate anterior, şi cu densităţi mari de celule, transferul de oxigen trebuie luat în consideraţie. Productivitatea enzimatică cea mai mare posibilă se obţine într-un bioreactor, la o capacitate maximă de transport de oxigen, aceasta fiind reflectată prin concentraţii mici ale oxigenului dizolvat în timpul fermentaţiei.

În bioreactor agitarea şi injectarea aerului din compresor sunt utilizate pentru a amesteca conţinutul din vas şi pentru transferul de gaze.

Calitatea şi cantitatea inoculului au un rol important în obţinerea unor metaboliţi cu viteze şi randamente mari de biosinteză. Starea fiziologică a microorganismelor ce formează inoculul ca şi cantitatea acestuia influenţează productivitatea enzimatică, fiind astfel necesară utilizarea unui inocul standardizat.

În cazul bacteriilor din genul *Bacillus*, inoculul este format fie din celule tinere în fază logaritmică de creştere (12–16 ore de incubare), care posedă un nivel ridicat de ADN (inoculul „vegetativ") fie din spori (inoculul „sporifer"). Celulele vegetative bacteriene folosite ca inocul produc de patru ori mai multă protează decât materialul sporulat. Există valori limită de vârstă şi număr de celule care pot fi utilizate ca inocul la însămânţarea mediilor de cultură pentru a produce enzime proteolitice cu activităţi mari. La depăşirea acestor limite se acumulează biomasă multă într-un timp scurt, dar neproductivă. Cantitatea de inocul în cazul tulpinilor de *Bacillus subtilis* are influenţă asupra stadiilor ulterioare ale culturii, determinând diferite stări fiziologice ale celulelor, funcţie de care variază capacitatea de biosinteză a proteazei. Masa minimă de inocul care permite dezvoltarea culturii bacteriene depinde însă de compoziţia substratului. Utilizarea unui inocul „mic" duce la prelungirea fazei de *lag*, în ciuda prezenţei celulelor viabile, făcând ineficient bioprocesul. În general, masa de inocul pentru biosinteza proteazelor cu tulpini de *Bacillus subtilis* este de maximum 5% faţă de mediul de cultură, cu aproximativ 10^5 cel/ml.

Unii autori recomandă introducerea în trepte a inoculului şi anume: iniţial –$1x10^5$ cel/ml, iar după 10 ore de cultivare se mai adaugă 2 ml % – cultură de 16 ore. Prin inocularea în trepte se scurtează durata cultivării cu aproximativ 5 ore, iar activitatea proteolitică creşte cu 50%.

Biosinteza proteazelor neutre şi alcaline este realizată de formele „R" (rough = rugoase) de colonii de *Bacillus subtilis*, care sporulează intens chiar pe

medii sintetice, minimale; formele „S" (*smouth* = netede), care nu sporulează nici pe medii complexe, sunt neproductive.

Atunci când se utilizează un inocul „sporifer" al unor tulpini din genul *Bacillus,* gradul de sporulare trebuie să fie de 90–95%. Pentru inducerea sporulării se folosesc medii de cultură speciale, în general solide, în funcție de microorganism.

Un procedeu frecvent folosit pentru sporii bacterieni este acela de a-i supune unui șoc termic subletal, anterior inoculării. Prin acest tratament, gradul de uniformitate și reproductibilitate al inoculului este mult mai ridicat și, în majoritatea cazurilor, durata fazei de germinare se scurtează, iar procentul sporilor care germinează crește.

În literatura de specialitate sunt publicate puține detalii referitoare la procesul industrial de obținere a proteazelor din *Bacillus.*

Aunstrup și colaboratorii oferă detalii sumare privind desfășurarea procesului de biosinteză a proteazelor într-un bioreactor pilot de 0,55 m^3: temperatura de cultivare a fost de 34°C, debitul de aer 0,7–0,9 l/l mediu/min, durata fermentației 2–5 zile, depinzând de tulpina utilizată.

Markkanen și Boiley au arătat că tulpinile de *Bacillus subtilis* cultivate în bioreactoare de 6 și 10 l produc maximum de proteaze la un debit de aer de 0,7 l/l mediu/min [Markkanen și Boiley, 1974]; activitatea protează a fost optimă când concentrația oxigenului dizolvat a fost menținută la o saturație de 50%. Coeficientul de transfer de oxigen ($K_L \cdot a$) a fost, în cazul unei productivități maxime de proteaze, de 237 h^{-1}.

15.7.3. Dinamica biosintezei proteazelor neutre cu tulpini de *Bacillus subtilis*

În general, tulpinile de *Bacillus subtilis,* producătoare de enzime, prin cultivare în sistem submers biosintetizează și elimină în mediul de cultură un complex enzimatic conținând atât proteaze (neutre și alcaline) cât și amilaze (în special α-amilază), în funcție de mediul de cultură utilizat precum și de parametrii de biosinteză stabiliți. Tulpinile care au fost selecționate prin mutageneză în scopul producerii unei anumite enzime biosintetizează cu preponderență acea enzimă pentru care a fost selecționată, nefiind însă suprimată complet biosinteza celorlalte enzime. Tulpinile care au suferit modificări genetice produc, de asemenea, în cantitate mare enzima pentru care s-a efectuat modificarea respectivă.

La producerea de protează în cadrul genului *Bacillus,* există o strânsă corelație între ciclul de dezvoltare al celulelor și starea fiziologică a acestora. Astfel, biosinteza și eliberarea proteazei în mediul de cultură are loc către sfârșitul

fazei de creştere logaritmică şi este însoţită de sporulare. Proteaza neutră se formează în faza de creştere logaritmică, iar proteaza alcalină în perioada de sporulare. S-a observat că producerea de proteaze este însoţită de creşterea bruscă a *p*H-ului mediului de cultură (fig. 15.8).

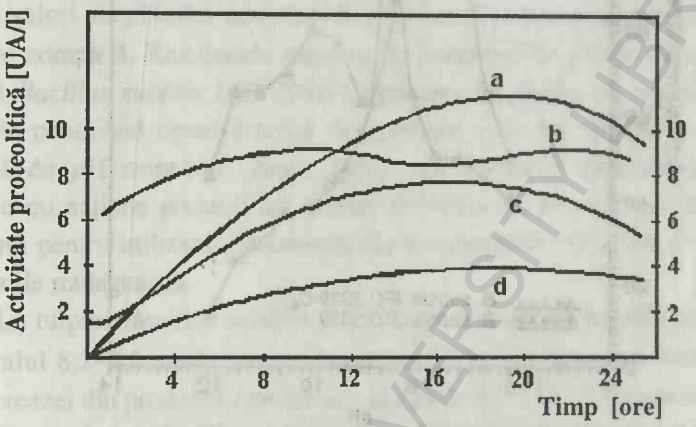


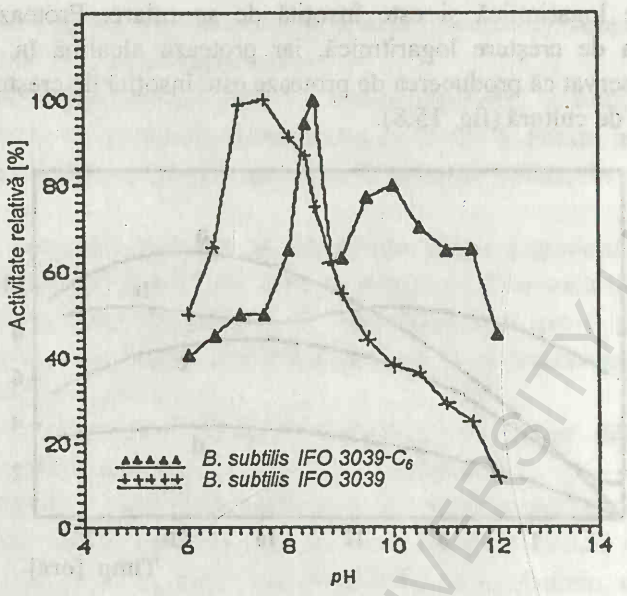
Fig. 15.8. Dinamica acumulării enzimelor proteolitice în culturi submerse de *Bacillus subtilis*: *a* – proteaze neutre; *b* – *p*H-ul mediului de fermentaţie; *c* – biomasă; *d* – proteaze alcaline.

15.7.4. Caracterizarea biochimică a proteazelor extracelulare produse cu tulpini de *Bacillus subtilis*

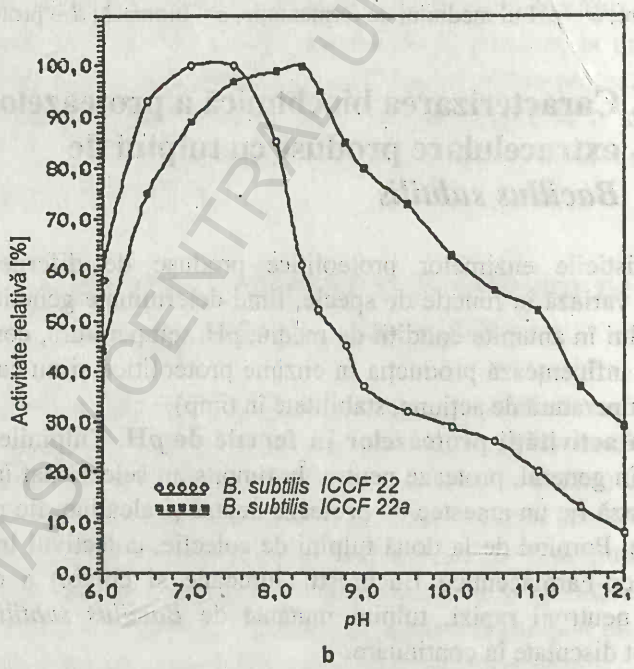
Caracteristicile enzimelor proteolitice produse de diferite tulpini de *Bacillus subtilis* variază în funcţie de specie, fiind determinate genetic. Cultivarea microorganismului în anumite condiţii de mediu, *p*H, temperatură, concentraţie de oxigen dizolvat, influenţează producţia în enzime proteolitice şi nu caracteristicile acestora (*p*H, temperatură de acţiune, stabilitate în timp).

Variaţia activităţii proteazelor în funcţie de *p*H. Tulpinile de *Bacillus subtilis* produc, în general, proteaze neutre. În timp, s-au selecţionat însă şi tulpini care biosintetizează fie un amestec de proteaze neutre şi alcaline, fie preponderent proteaze alcaline. Pornind de la două tulpini de colecţie, colectivul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice Bucureşti (Jurcoane şi colab.) a obţinut, prin mutageneză cu neutroni rapizi, tulpini mutante de *Bacillus subtilis,* ale căror caracteristici sunt discutate în continuare.

Din figura 15.9, *a* şi *b*, se observă că tulpinile parentale *Bacillus subtilis IFO 3039* şi *Bacillus subtilis ICCF 22* sunt producătoare de proteaze în zona de *p*H neutru cu maxime la *p*H = 7,5 şi respectiv 7, în timp ce tulpinile selecţionate *Bacillus subtilis IFO 3039-C6* şi *Bacillus subtilis ICCF 22a* produc proteaze în zona de *p*H alcalin, cu valori maxime situate în intervalul 8–11.



a



b

Fig. 15.9. Efectul variațiilor de *p*H asupra activității proteazelor extracelulare produse de tulpinile:

a – *Bacillus subtilis IFO 3039* și *Bacillus subtilis IFO 3039-C6*;

b – *Bacillus subtilis ICCF 22* și *Bacillus subtilis ICCF 22a.*

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La *Bacillus subtilis IFO 3039-C_6* s-a observat însă existența a două maxime de activitate protează, la *p*H = 8,5 și, respectiv, *p*H = 10. La *p*H = 11, enzimele produse de această tulpină mutantă prezintă 60% din activitatea maximă, față de cele produse de tulpina parentală a cărei activitate la *p*H = 11 este de numai 20%. La valori ale *p*H-ului mai mari decât 12, activitatea proteazică scade până la inactivare completă. Rezultatele obținute în domeniul de *p*H 8–11 se explică prin faptul că *Bacillus subtilis IFO 3039-C_6* produce în mediu un complex enzimatic proteolitic conținând tipuri diferite de proteaze, care își manifestă activitatea în domeniul de *p*H respectiv. Acest lucru este favorabil producerii de preparat enzimatic cu acțiune proteolitică într-un domeniu de *p*H cât mai larg (trăsătură importantă pentru utilizarea în compoziția detergenților) și a fost obținut în urma lucrărilor de mutageneză.

La tulpina *Bacillus subtilis ICCF 22a* s-a observat un *p*H optim de acțiune în intervalul 8,2–8,5, comportarea proteazelor fiind în acest caz asemănătoare cu cea a proteazei din produsul comercial „Alcalază- NOVO" (Danemarca).

Deși tulpina *Bacillus subtilis IFO 3030-C_6* prezintă în intervalul de *p*H alcalin două maxime de activitate – corespunzând valorilor de *p*H 8,5 și 10, activitatea enzimatică proteolitică este inferioară celei obținute cu tulpina de *Bacillus subtilis ICCF 22a.* Astfel, la un *p*H = 8,5 pentru *Bacillus subtilis IFO 3039-C_6* s-a obținut o activitate enzimatică de 1 UA/l față de 4 UA/l pentru tulpina de *Bacillus subtilis ICCF 22a.* Din acest motiv, pentru obținerea unui preparat enzimatic proteolitic activ în domeniul alcalin se recomandă tulpina de *Bacillus subtilis ICCF 22a.*

Temperatura optimă de activitate a proteazelor extracelulare produse de tulpinile de *Bacillus subtilis*. În general, proteazele extracelulare produse cu tulpini de *Bacillus subtilis* au activitate într-un domeniu larg de temperatură (20...60°C), nefiind însă cunoscute ca enzime termorezistente. Exemplificăm prin rezultatele obținute de colectivul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice București. Efectul acestui parametru s-a urmărit prin determinarea activității enzimatice proteolitice, la diferite temperaturi în intervalul 25...80°C și la *p*H = 8,5. Din figura 15.10 se observă că activitatea proteazelor extracelulare produse de tulpina mutantă de *Bacillus subtilis IFO 3039-C_6* este maximă la temperatura de 65°C, iar a celor din *Bacillus subtilis ICCF 22a* la 60°C. În acest din urmă caz, la temperatura de 70°C activitatea proteazelor este de circa 63% din activitatea maximă manifestată la 60°C. Comportamentul acestor proteaze față de diferite valori de temperatură este asemănătoare cu cel al Alcalazei NOVO.

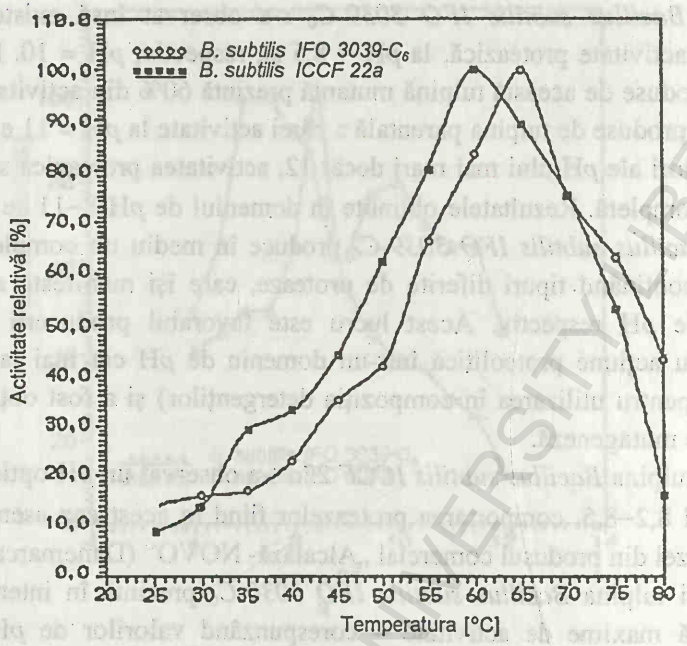


Fig. 15.10. Efectul temperaturii asupra activității proteazice extracelulare produse de tulpinile: *Bacillus subtilis IFO 3039-C_6* și *Bacillus subtilis ICCF 22a*.

Stabilitatea în timp a proteazelor neutre și alcaline izolate din mediile fermentate de *Bacillus subtilis*. Enzimele proteolitice din tulpini de *Bacillus subtilis* au, în general. o stabilitate redusă în timp și de aceea se impun condiții speciale de păstrare (la temperaturi scăzute, sau condiționate într-o formă specială cu agenți protectori).

Efectul temperaturii asupra stabilității activității proteazelor s-a urmărit prin menținerea lichidului de cultură obținut cu tulpina *Bacillus subtilis ICCF 22a*, timp de 60 min la diferite valori termice cuprinse între 25 și 70°C, ulterior determinându-se activitatea reziduală în condițiile metodei de analiză (temperatură 37°C, *p*H = 8,5, substrat de cazeină). Rezultatele obținute au relevat că menținerea extractului la temperaturi cuprinse în acest interval, timp de 60 de min, conduce la scăderi ale activității enzimatice, la 60°C regăsindu-se 53% din activitatea proteolitică inițială (tabelul 15.9).

În scopul examinării stabilității față de *p*H, extractul enzimatic a fost menținut la diferite valori de *p*H cuprinse în intervalul 6–12, timp de 18 ore, la 25°C, după care au fost determinate activitățile reziduale. Datele obținute au evidențiat o menținere a activității enzimatice de 81–93% pentru domeniul de *p*H = 6,0–9,0 (tabelul 15.10).

Tabelul 15.9

Efectul temperaturii asupra stabilității activităților enzimatice ale proteazelor din *Bacillus subtilis ICCF 22a*

Temperatura [°C]	Activitate enzimatică după 60 min [UA/l]	Activitatea reziduală relativă [%]
22	4,38	99
30	4,20	95
37	4,40	100
40	3,80	86
50	3,50	79
60	2,32	53
70	1,08	24

Tabelul 15.10

Influența valorilor de *p*H asupra stabilității proteazelor alcaline produse de *Bacillus subtilis ICCF 22a*

*p*H-ul	Activitatea enzimatică după 18 ore [UA/l]	Activitatea relativă* [%]
6,0	5,2	88
7,0	5,4	91
8,0	5,5	93
9,0	4,8	81
10,0	4,2	71
11,0	3,5	60
12,0	2,2	37

* Activitatea inițială a enzimei față de care s-a calculat activitatea relativă a fost de 5,8 UA/l, determinată la *p*H = 8,5, în aceleași condiții.

15.8. BIOSINTEZA PROTEAZELOR FUNGICE

15.8.1. Medii de cultură

Biosinteza enzimelor proteolitice cu ajutorul fungilor se realizează prin cultivarea tulpinilor selecționate pe medii de cultură semisintetice sau naturale, care conțin, de regulă, o sursă de carbon, o sursă de azot, factori de creștere și microelemente. Sursa de carbon (glucidele) din compoziția mediilor de cultură reprezintă sursa de energie și participă activ la metabolismul celulei. Concentrația sursei de carbon în mediul de cultură poate varia între 1 și 15 %, în funcție de microorganismul utilizat. Sursa de carbon este reprezentată, de obicei, de: glucoză, lactoză, amidon.

Pentru cultivarea fungilor de *Aspergillus oryzae* se pot utiliza următoarele formule de mediu nutritiv:

- mediu Czapek-Dox:
  - glucoză 3 g %
  - $NaNO_3$ 0,3 g %
  - K_2HPO_4 0,1 g %
  - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 g %
  - KCl 0,05 g %
  - $FeSO_4$ 0,001 g %
  - agar-agar 1,3 g %
- mediu cu extract de drojdie (yeast – peptone – glucose) (YPG):
  - extract de drojdie 0,5 g %
  - peptonă 0,5 g %
  - glucoză 2 g %
  - agar-agar 2 g %
- mediu minimal pentru genul *Aspergillus* (MAM):
  - glucoză 1 g %
  - $NaNO_3$ 6 g %
  - KH_2PO_4 1,52 g %
  - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,52 g %
  - KCl 0,52 g %
  - $FeSO_4$ 0,001 g %
  - $ZnSO_4$ 0,001 g %
  - agar-agar 1,5 g %
- mediu cu lactoză (M):
  (mediu martor)
  - făină de soia 2,5 g %
  - lactoză 1,5 g %
  - KH_2PO_4 0,4 m
  - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,012 g %
- mediu cu glucoză (M1):
  - făină de soia 2,5 g %
  - glucoză 1 g %
  - KH_2PO_4 0,4 M
  - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,012 g %
- mediu cu amidon (M2):
  - făină de soia 2,5 g %
  - amidon solubil 2 g %
  - KH_2PO_4 0,4 m
  - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,012 g %
- mediu cu melasă (M3):
  - făină de soia 2,5 g %
  - melasă 10 g %
  - KH_2PO_4 0,4 m
  - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,012 g %

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

– mediu cu extract de porumb (M4):

făină de soia	2,5 g %
amidon solubil	2 g %
extract de porumb	0,5 g %
KH_2PO_4	0,2 M
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,012 g %

Mediile solide (agarizate) Czapek, YPG şi respectiv MAM se sterilizează 10 min la 105°C, în timp ce mediile lichide menţionate se sterilizează 20 min la 135°C, cu o prehidroliză termică de 60 min la 100°C. Pentru mediile cu lactoză (M1), sterilizarea se realizează la 105°C, timp de 10 min.

15.8.2. Condiţii de cultivare

Fungii filamentoşi din genul *Aspergillus* dezvoltă o biomasă specifică în care se acumulează enzime proteolitice la diferite valori ale *p*H-ului. Astfel, sinteza enzimatică în culturi de *Aspergillus sojae, Aspergillus oryzae şi Aspergillus niger* se realizează la *p*H = 5,0–5,5, în timp ce *Aspergillus terreus* sintetizează proteaze la *p*H = 6,0–6,5. Acumularea enzimelor proteolitice în mediul de cultură este acompaniată de creşterea bruscă a *p*H-ului, indicând astfel intrarea în faza staţionară a bioprocesului. Pentru fungii producători de enzime proteolitice temperatura variază între 26 şi 32 °C.

În cultivarea submersă a fungilor pentru producerea enzimelor proteolitice este importantă stabilirea unei corelaţii optime între agitarea şi aerarea mediului, astfel încât să nu se producă fragmentarea hifelor, dar în acelaşi timp să se poată asigura un conţinut optim de oxigen în mediu necesar sintezei enzimatice.

Cantitatea şi calitatea inoculului sunt alţi parametri care influenţează procesul de biosinteză a proteazelor la fungi. În procesele industriale se folosesc 1–2 trepte de inoculare pornind de la inoculul sporifer. Pentru relizarea inoculului sporifer sunt necesare două faze:

– reactivarea microorganismului prin repicare din cultura stoc, purificarea şi testarea capacităţii de producţie;

– inocularea fungului pe un mediu de sporulare adecvat (de obicei must de malţ agarizat).

În următoarea treaptă de inoculare, celulele vegetative pot fi obţinute prin cultivarea sporilor pe un mediu lichid a cărui compoziţie se stabileşte la nivel de laborator (mediu de inocul laborator). Inoculul vegetativ utilizat în biosinteza pilot sau industrială se obţine prin prelevarea celulelor vegetative dintr-o fază timpurie de creştere, de obicei din faza exponenţială.

Cantitatea de inocul influenţează mărimea şi forma aglomerărilor miceliene, fenomenul de dimorfism precum şi randamentul în enzime proteolitice. Astfel, în cazul fungilor de *Aspergillus oryzae*, culturile amorsate cu cantităţi reduse de inocul se caracterizează printr-o viteză redusă de dezvoltare şi, în

consecinţă, producţii mici în enzime. Dimpotrivă, cantităţi maxime de miceliu conduc la un metabolism ineficient, deoarece este metabolizată o cantitate mare de glucide şi concomitent are loc eliminarea în mediu a unei cantităţi mari de compuşi cu azot organic.

15.8.3. Dinamica biosintezei enzimelor proteolitice în culturi submerse de *Aspergillus oryzae*

Biosinteza enzimelor proteolitice cu tulpini de *Aspergillus oryzae* a fost studiată în cadrul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice Bucureşti, secţia Biosinteze, în perioada 1993–1997, finalizându-se cu realizarea unor produse enzimatice de interes farmaceutic [Jurcoane şi colab., 1995]. Astfel, în ceea ce priveşte parametrii optimi de cultivare a tulpinii *Aspergillus oryzae ICCF 20-9* în condiţii de micropilot, rezultatele obţinute în experimentele efectuate pe mediul de cultură M4, pe bază de amidon şi făină de soia (subcapitolul 15.8.1) au indicat o temperatură de 30°C, agitare variabilă – 300, 400, 600 şi 800 rot/min, corespunzând la 18, 24, 30, 36 şi, respectiv, 40 ore de fermentaţie, debit de aer: 0,8 l/l mediu/min.

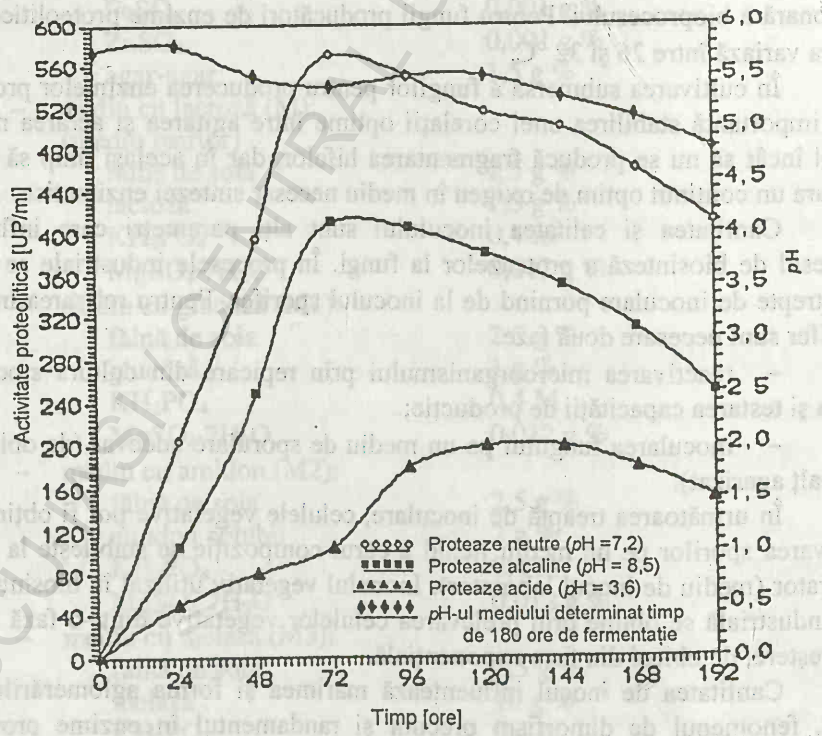


Fig. 15.11. Profilul activităţii proteolitice în cultura de *Aspergillus oryzae ICCF 20-9*.

Profilul activității enzimatice a proteazelor extracelulare biosintetizate de tulpina *Aspergillus oryzae ICCF 20-9*, cultivată timp de 168 de ore în aceste condiții, se poate urmări în figura 15.11. După cum se observă, biosinteza proteazelor neutre este maximă după 40–48 de ore de cultivare, a proteazelor alcaline între 48–60 de ore, iar a celor acide după 60 de ore. De remarcat că există o interdependență între natura proteazelor biosintetizate pe parcursul fermentației și profilul de *p*H al mediului. Ținând cont de acest fapt, pentru obținerea și purificarea proteazelor neutre, fermentația a fost întreruptă în momentul în care valoarea *p*H-ului a scăzut la 5,5 (de obicei după 48 de ore de cultivare).

În acest caz nivelul de activitate proteazică în mediul de cultură s-a situat între 350 și 550 UP/ml, comparabil cu cel indicat în literatura de specialitate pentru tulpini de *Aspergillus oryzae* bune producătoare de proteaze neutre.

15.8.4. Procedee de izolare și purificare a enzimelor proteolitice fungice

În cazul proteazelor, metodele electroforetice sunt utilizate pe scară largă atât în scopuri analitice cât și preparative. Cel mai des utilizate sunt: electroforeza în gel de poliacrilamidă (PAGE), gelurile fiind realizate prin inducerea polimerizării acrilamidei și N, N'-metilenbisacrilamidei într-un tampon ales, și electroforeza în gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu (SDS – PAGE). În acest din urmă caz, detergentul SDS denaturează proteinele formând complexe SDS/proteină care diferă numai prin masa lor moleculară, separarea bazându-se atât pe diferența de încărcare electrică a moleculelor, cât și pe diferența de masă moleculară (gel-filtrare).

Literatura de specialitate indică utilizarea metodei SDS - PAGE la caracterizarea proteazelor microbiene după o serie de purificări anterioare, prin demonstrarea omogenității electroforetice a preparatelor respective. Astfel, o protează intracelulară din *Pseudomonas carboxyhidrogena* s-a purificat până la o omogenitate de peste 95% în 5 trepte, determinându-se greutatea moleculară prin SDS-PAGE, găsindu-se două subunități de 70 000 și respectiv 56 000 Da. În alt caz, purificarea și caracterizarea unei proteaze alcaline din microorganismul alcalofil *Thermoactinomyces sp. HS 682* s-a efectuat doar printr-o tehnică electroforetică utilizând două coloane cromatografice Butyl-Toyopearl 650 M și Toyopearl 650 S.

Enzima purificată are o masă moleculară aparentă de 25 000, determinată prin gel-filtrare de Sephadex G-75 și SDS - PAGE și un punct izoelectric la *p*H = 11.

Metodele electroforetice s-au utilizat, de asemenea, de către un colectiv de cercetători japonezi în clonarea și caracterizarea unei proteaze alcaline din *Bacillus sp. AH 101*. Clonarea s-a efectuat pe *Escherichia coli* și proteaza s-a purificat de 70 de ori cu un randament de 10%. Greutatea moleculară s-a estimat la 36 800, prin SDS-PAGE.

Purificarea şi proprietăţile proteinazei acide din genul *Monoscus sp. No 3404* s-au efectuat prin gelfiltrare şi SDS poliacrilamid – electroforeză. Proteaza alcalină secretată de către *Pseudomonas maltrophylis 27* s-a purificat până la omogenitate prin fracţionare cu $(NH_4)_2SO_4$ cromatografie pe Sephadex G-200 şi Sephadex G-75 şi electroforeză preparativă pe poliacrilamidă. Masa sa moleculară a fost 76 000. Proteaza conţine 2 subunităţi ca mase moleculare diferite: 31 000 şi 44 000 Da.

Punerea în evidenţă şi caracterizarea proteazelor extracelulare din *Bacillus subtilis* a proteazelor alcaline termostabile din *Bacillus SD 521*, a proteazelor alcaline din fungul *Aspergillus flavus* şi a proteazelor neutre din celulele de *Geotrechum lactis* s-a efectuat, de asemenea, prin metode electroforetice.

Separarea biomasei. Cercetările de izolare a enzimelor proteolitice din mediul de fermentaţie au ca scop obţinerea unor preparate enzimatice utilizabile în medicină (de exemplu, la curăţirea plăgilor necrotice şi la eliminarea sfacelelor înainte de aplicarea cicatrizantelor locale şi ca medicamente enzimatice digestive).

Tulpinile din genul *Aspergillus* produc atât protează intracelulară cât şi extracelulară. Din determinările de activitate proteolitică efectuate în lichidul de cultură şi în miceliul de *Aspergillus oryzae ICCF 20-9* (tabelul 15.11) s-a constatat că proteazele extracelulare sunt preponderente, astfel încât din mediul fermentat interesează lichidul obţinut după separarea biomasei fungice.

Tabelul 15.11

Biosinteza proteazelor intra- şi extracelulare cu tulpina *Aspergillus oryzae ICCF 20-9*

Natura proteazelor biosintetizate	Volumul [ml]	Activitatea proteolitică [UP/ml]	Activitatea proteolitică totală [UP]
Intracelular: extract de miceliu (raport de extracţie 1/3)	60	200	12 000
Extracelular: lichid de cultură	84	500	42 000

Separarea biomasei de *Aspergillus oryzae* nu prezintă dificultăţi deosebite, dată fiind structura filamentoasă a miceliului. Din tabelul 15.12 se poate observa că viteza de filtrare a acesteia la vacuum este mare chiar fără adaos de adjuvant de filtrare (300 $l/m^2 \cdot h$).

Tabelul 15.12

Influenţa procedeului de separare a biomasei bacteriene asupra vitezei de filtrare
Volum mediu: 904 ml, $S = 113$ cm^2

Procedeul de separare	Timpul, [min]	Viteza de filtrare, [l/m^2h]
Filtrare, cădere liberă	120	40
Filtrare, vacuum	16	300
Filtrare, vacuum, adaos 0,5% celită	15	320

Concentrarea prin ultrafiltrare. În cazul proteazelor, metoda ultrafiltrării este folosită pentru concentrarea şi purificarea acestora din mediul de cultură perfect limpede rezultat în urma operaţiei de filtrare.

Astfel, utilizând o membrană ACV 300 – limita de excludere 13 kDa, s-a reuşit concentrarea unei proteaze alcaline din extractul brut obţinut de la o cultură de *Aspergillus soyae*. Adeseori se apelează la procedeul de ultrafiltrare în trepte. În acest sens, folosind o membrană de tip TS-3000 şi o membrană TS 10, a fost realizată purificarea şi concentrarea unei proteaze neutre din cultura de *Bacillus subtilis*.

De menţionat că valori ridicate ale fluxului de filtrat şi respectiv ale randamentului în produs s-au obţinut cu membrane polisulfonice şi cu floculanţi polimerici cationici şi/sau anionici.

Ultrafiltrarea prezintă avantajul efectuării operaţiei de concentrare la temperaturi scăzute, în paralel cu purificarea soluţiei de compuşii chimici cu mase moleculare mai mici decât enzima de interes, nemaifiind necesară dializa probei respective.

Astfel, în vederea concentrării soluţiilor native de proteaze rezultate în urma filtrării biomasei fungice, au fost utilizate prin comparaţie metoda clasică de concentrare sub vid (pe un rotavapor tip Buchi) şi metoda concentrării prin ultrafiltrare pe membrane Millipore tip polisulfonic PTGC 000 05/NMWL 10 kDa. Aplicarea primei metode a condus la obţinerea unor randamente scăzute de recuperare a activităţii enzimatice, datorită denaturării termice a enzimelor, operaţia efectuându-se la temperaturi cuprinse între 40 şi 45°C. Din tabelul 15.13 se observă o creştere a activităţii enzimatice o dată cu scăderea temperaturii.

Tabelul 15.13

Influenţa temperaturii de concentrare asupra activităţii proteazice din *Aspergillus oryzae*

Temperatura [°C]	Iniţial		Final		Randament (în activitate) [%]
	Volum [ml]	Activitate [UP/ml]	Volum [ml]	Activitate [UP/ml]	
45	250	371	75	633	51,18
43	480	515	110	1520	67,63
41	1080	615	400	1122	69,66
40	750	326	150	1303	79,63

Aplicarea metodei de concentrare tip ultrafiltrare a permis remedierea acestui inconvenient, realizându-se totodată o purificare suplimentară – de cca 2,5 ori – a proteazelor microbiene. Studiile de purificare prin ultrafiltrare au fost efectuate prin operaţii repetate de diafiltrare. Procedeul aplicat a fost discontinuu, cu concentrări şi diluări repetate, până la volumul iniţial, urmate de concentrarea finală. Rezultatele acestor studii sunt inserate în tabelul 15.14.

Tabelul 15.14

Etapele purificării prin ultrafiltrare și diafiltrare a proteazelor microbiene produse de *Aspergillus oryzae 20-9*

Etapa de purificare	Volumul [ml]	Conținutul în proteaze [mg/ml]	Activitatea enzimatică		Activitatea specifică	Factorul de purificare (FP)*	Randamentul pe fază [%]
			[UP/ml]	Totală [UP]			
Soluția inițială I	850	7,10	507	$0,43 \cdot 10^6$	71,4		
Concentrat I	200	14	1593	$0,31 \cdot 10^6$	113,78	1,59	73,92
Soluția inițială II	850		371	$0,31 \cdot 10^6$			
Concentrat II	210	6,90	1158	$0,24 \cdot 10^6$	167,82	2,35	77,11
Soluția inițială I	5500	5,80	398	$2,18 \cdot 10^6$	68,62		
Concentrat I	1000	16,20	1520	$1,52 \cdot 10^6$	93,82	1,36	69,42
Soluția inițială II	2800		543	$1,52 \cdot 10^6$			
Concentrat II	200	34,50	7240	$1,44 \cdot 10^6$	209,85	3,05	95,23
Soluția inițială I	1265	7,40	1140	$1,44 \cdot 10^6$	154		
Concentrat I	305	15,60	4100	$1,25 \cdot 10^6$	2,63	1,7	86,71
Soluția inițială II	1000		1250	$1,25 \cdot 10^6$			
Concentrat II	280	13	4300	$1,20 \cdot 10^6$	330	2,1	96,28
Soluția inițială III	1000		1204	$1,20 \cdot 10^6$			
Concentrat III	355	9,20	3240	$1,15 \cdot 10^6$	352,17	2,3	95,53
Soluția inițială IV	1200		960	$1,15 \cdot 10^6$			
Concentrat IV	260	9,60	3840	$0,99 \cdot 10^6$	400	2,6	86,66
Soluția inițială I	1000	8,75	1320	$1,32 \cdot 10^6$	150,8		
Concentrat I	170	32,5	7600	$1,29 \cdot 10^6$	233,84	1,55	97,87
Soluția inițială II	800		1620	$1,29 \cdot 10^6$			
Concentrat II	260	14,5	4200	$1,09 \cdot 10^6$	289,65	1,92	84,25
Soluția inițială III	850		1280	$1,09 \cdot 10^6$			
Concentrat III	150	20	6800	$1,02 \cdot 10^6$	340	2,25	93,75

* FP calculat după fiecare fază de diafiltrare s-a raportat la soluția inițială supusă purificării.

În scopul stabilirii condițiilor optime de lucru la faza de ultrafiltrare a proteazelor microbiene din *Aspergillus oryzae*, s-au efectuat determinări ale fluxului de filtrat în funcție de presiunea trasmembranară aplicată în cursul operației. Astfel, în figura 15.12 sunt redate variațiile fluxului de filtrat, funcție de presiunea transmembranară pentru soluții native obținute din două experiențe de biosinteză (S_7, S_8). Pentru ambele soluții se constată instalarea fluxului limită la presiuni de 90–120 kPa, cu valori cuprinse între 10 și 15 l/m^2·h. Se verifică astfel modelul fluxului liniar datorat fenomenului de gel-polarizare. Permeabilitatea pentru apă a membranelor scade ca urmare a colmatării, efectul fiind marcant la valori superioare ale presiunii de lucru.

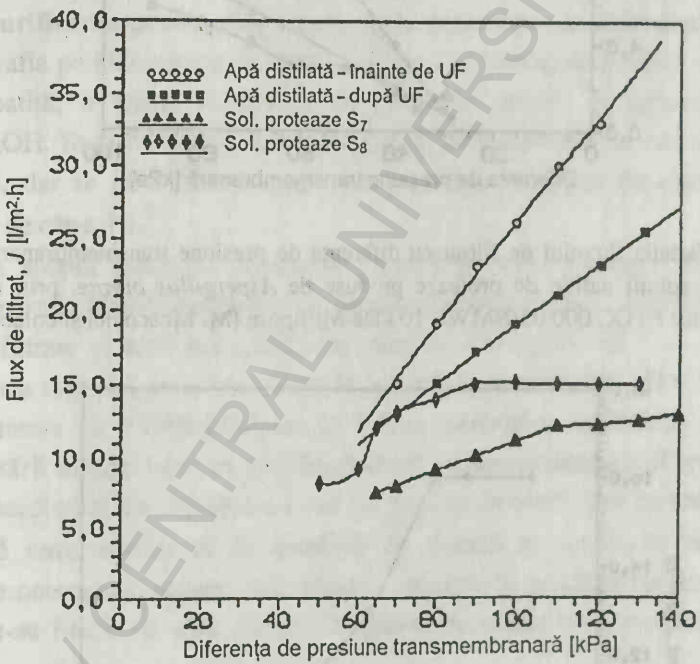


Fig. 15.12. Variațiile fluxului de filtrat în funcție de diferența de presiune transmembranară la ultrafiltrarea unor soluții native de proteaze produse de *Aspergillus oryzae* prin membrane polisulfonice PTGC-Millipore (M. Moscovici și colab., 1995).

Experiențele ulterioare s-au efectuat la o presiune transmembranară corespunzătoare aprecierii de valoarea fluxului limită (85–90 kPa).

În figura 15.13 se prezintă variația fluxului de filtrat funcție de diferența de presiune transmembranară la ultrafiltrarea unei soluții native de proteaze obținută la nivel micropilot ($S_3 - M_p$). Se observă că valoarea maximă a fluxului de filtrat de 4–6 l/m^2·h este atinsă la 70–90 kPa, când apare tendința de flux limitat caracteristic polarizării de concentrație.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

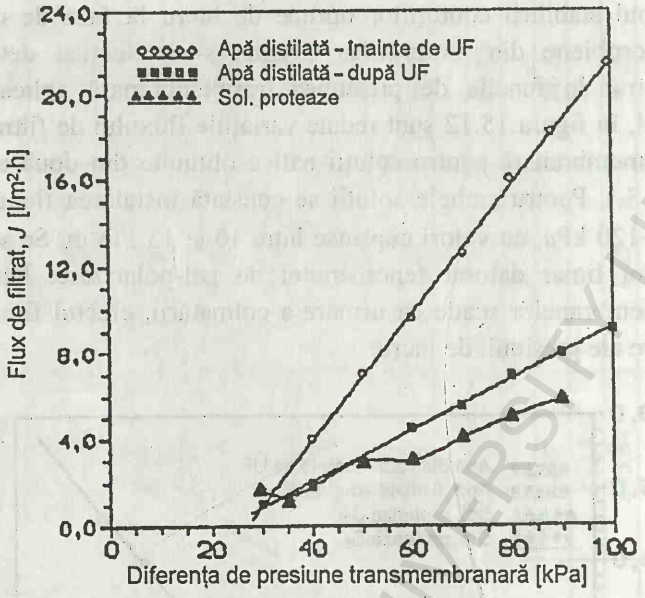


Fig. 15.13. Variația fluxului de filtrat cu diferența de presiune transmembranară la ultrafiltrarea unor soluții native de proteaze produse de *Aspergillus oryzae*, prin membrane polisulfonice PTGC 000 05/NMWL 10 kDa-Millipore (M. Moscovici şi colab., 1995).

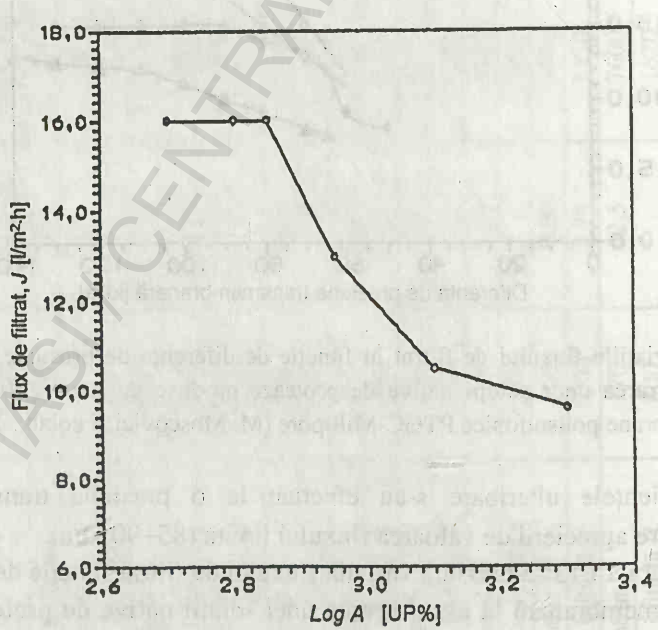


Fig. 15.14. Fluxul de filtrat, funcție de activitatea soluției native de proteaze produse de *Aspergillus oryzae*, separate prin ultrafiltrare pe membrane polisulfonice PTGC-Millipore (M. Moscovici şi colab., 1995).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Figura 15.14 prezintă fluxul de filtrat, funcție de (*log*) concentrației (activitatea) soluției. În prima porțiune a curbei se constată aspectul caracteristic modelului gel-polarizării cu apariția concentrației critice de formare a gelului corespunzând ariei valorii de 1300 UP/ml. În porțiunea descrescătoare, variația fluxului se abate de la modelul tipic al gelului de concentrație constantă. Fluxul de filtrat scade, curba căpătând un aspect asimptotic, ceea ce corespunde unei modificări în concentrația stratului de suprafață.

Rezultatele cantitative ale concentrării soluțiilor native de proteaze din *Aspergillus oryzae 20-9* obținute la probele S_1, S_2, S_3 – M_p sunt prezentate în tabelul 15.14 la presiuni transmembranare cuprinse între 70 și 90 kPa.

Purificarea proteazelor neutre prin adsorbție pe hidroxilapatită. Prin cromatografia pe hidroxilapatită, proteinele sunt absorbite de gelurile cristaline de hidroxilapatită, o formă insolubilă de fosfat de calciu cu formula empirică $Ca_5(PO_4)_3OH$. Baza fizico-chimică a acestui tip de fracționare nu este în întregime cunoscută, dar se pare că este implicată adsorbția anionilor de către Ca^{2+} și a cationilor de către PO_4^{3-}.

În scopul separării proteazelor neutre de cele alcaline, soluția nativă obținută în urma filtrării miceliului de *Aspergillus oryzae* a fost supusă concentrării prin ultrafiltrare și apoi precipitării cu acetonă (în raport 1/3 *o/o*). Precipitatul colectat prin centrifugare a fost reluat în tampon fosfat 0,01 M, *p*H = 7,2 și supus unui tratament cu DEAE-celuloză în scopul adsorbției amilazelor prezente și depigmentării soluției înaintea cromatografierii pe hidroxilapatită. Filtratul rezultat în urma decolorării cu DEAE-celuloză s-a aplicat pe o coloană cu hidroxilapatită (10 × 1,5 cm), echilibrată în prealabil cu soluție de acetat de calciu 0,1%. Proteazele neutre s-au separat prin eluarea coloanei în gradient de tampon fosfat, culegându-se fracții de câte 10 ml. Diagrama de eluție este prezentată în figura 15.15.

Fracțiile corespunzând eluției cu tampon fosfat 0,1 m au fost reunite, concentrate și liofilizate și denumite în prezentul text *fracția C*.

În urma acestor etape de purificare s-a obținut un preparat enzimatic purificat cu activitate proteolitică specifică la *p*H = 7 de 1250 UP/mg proteine, factorul de purificare fiind 9,44 (tabelul 15.15).

Analiza activității enzimatice precum și studiile de inhibiție cu EDTA, efectuate asupra celor trei maxime din curba de eluție, au demonstrat proprietățile specifice de protează neutră a *fracției C* (tabelul 15.16).

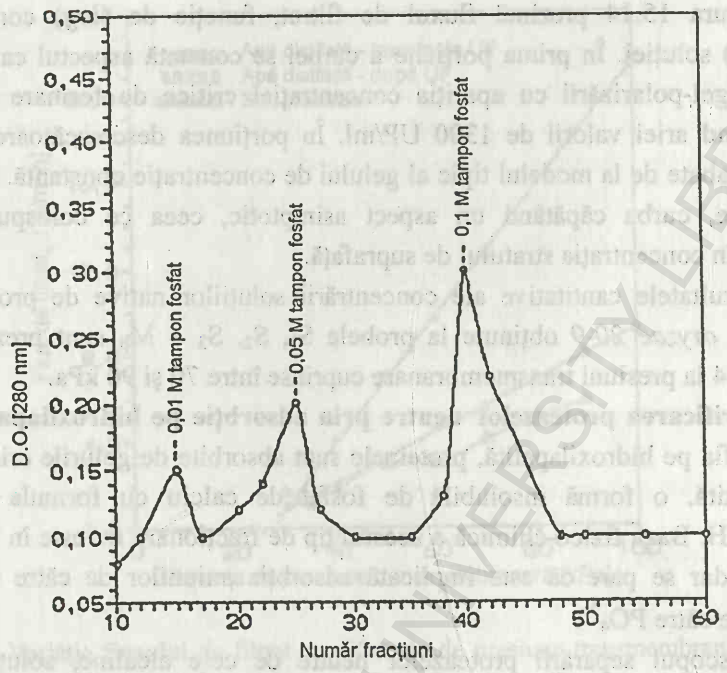


Fig. 15.15. Diagrama de eluție a proteazelor neutre din *Aspergillus oryzae ICCF 20-9* de pe hidroxilapatită (10 × 1,5 cm, volumul unei fracțiuni 10 ml).

Tabelul 15.15

Etapele purificării proteazelor neutre din *Aspergillus oryzae ICCF 20-9*

Etapa de purificare	Volum [ml]	Proteină [mg/ml]	Activitate totală [UP]	Activitate specifică [UP/mg]	Factor de purificare	Randament de recuperare [%]
Extract brut	5500	2,5	$182 \cdot 10^4$	132,4		100
Ultrafiltrare	1000	7,6	$165 \cdot 10^4$	217,1	1,63	90,7
Precipitare cu acetonă*	100	34	$142 \cdot 10^4$	417,6	3,15	78
Tratare cu DEAE-celuloză	105	28	$134 \cdot 10^4$	455,8	3,44	73,6
Adsorbție pe hidroxilapatită	250	1,6	$50 \cdot 10^4$	1250	9,44	27,5

* 8 g preparat enzimatic brut, dizolvat în 100 ml acetat de calciu, 0,1% şi centrifugat.

Caracterizarea prin metoda disc-electroforezei a proteazei neutre izolate, realizată pe parcursul purificării (figura 15.16), a demonstrat că aceasta este omogenă din punct de vedere electroforetic.

Masa moleculară a proteazei neutre izolate, determinată prin metoda gel-filtrării a fost de 37 kDa, în concordanță cu valorile indicate în literatură pentru proteaze neutre microbiene.

Studiile de separare a proteazelor neutre din extractul inițial brut de *Aspergillus oryzae 20-9* prin adsorbție pe hidroxilapatită și eluate în tampon fosfat 0,1 m, urmate de liofilizare, au condus la obținerea unui produs purificat, omogen din punct de vedere electroforetic.

Tabelul 15.16

Cromatografia pe hidroxilapatită a proteazelor din *Aspergillus oryzae ICCF 20-9*

Fracții de pe hidroxilapatită	Volum [ml]	Proteină [mg/ml]	Activitate* proteazică [UP/ml]	Activitate totală [UP]	Inhibiție** [10^{-3} m EDTA]	Inhibiție** [10^{-3} m DIFP]
A	45	0,6	850	$3,8 \cdot 10^4$	5	75
B	50	0,9	400	$2,0 \cdot 10^4$	–	–
C	250	1,6	2000	$50 \cdot 10^4$	85	0

* Determinată pe cazeină, la 37°C, *p*H = 7.

** Inhibiția activității proteazei, după o incubare de 30 min, cu soluție mM de inhibitor – EDTA și DIFP (diizopropil fluor fosfat) (exprimată în procente de inhibiție).

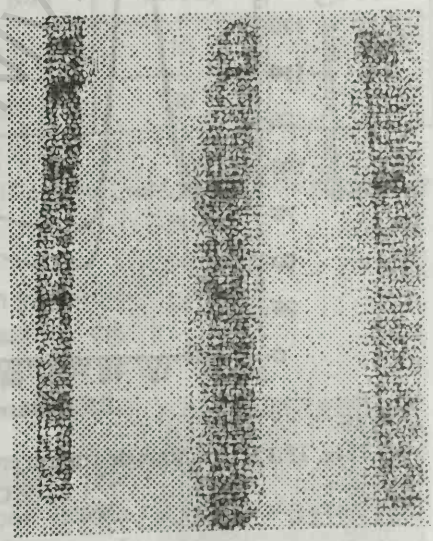


Fig. 15.16. Separarea electroforetică a proteazelor neutre din *Aspergillus oryzae ICCF 20-9* în diferite etape de purificare, la temperatura 25°C, în mediu alcalin (TRIS 0,05 m/glicocol, *p*H=8,8); 5 mA/tub, timp de 180 min; *A* – extract inițial brut; *B* – filtrat, după tratare cu DEAE-celuloză; *C* – eluat de pe hidroxilapatită (*fracția C*).

Purificarea proteazelor alcaline prin cromatografie pe CM-celuloză. Pentru separarea proteazelor alcaline din amestecul de proteaze existent în preparatul enzimatic brut de *Aspergillus oryzae*, s-a apelat la schimbătorul de cationi celulozic CM-celuloză.

Înainte de trecerea pe o astfel de coloană, preparatul enzimatic brut a fost supus operației de precipitare fracționată cu acetonă. S-a constatat că adăugarea a 1 volum acetonă în prezența acetatului de calciu 2% conduce la precipitarea unei fracțiuni bogate în amilaze (care se îndepărtează), proteazele neutre și alcaline rămânând în supernatant. Mărind concentrația solventului organic până la 66%, din

supernatant a precipitat o fracțiune îmbogățită în protează, care s-a separat prin centrifugare. Precipitatul obținut s-a redizolvat în soluție acetat de calciu 0,1%, la *p*H = 6,4 și s-a aplicat pe o coloană de CM-celuloză (11 × 2 cm). Proteaza alcalină s-a eluat cu NaCl 0,05 M în acetat de calciu 0,1%, culegându-se fracțiuni de 5 ml. Diagrama de eluție este prezentată în figura 15.17.

În urma acestor etape de purificare s-a obținut un preparat enzimatic purificat, cu activitate proteolitică specifică la *p*H = 8,8 de 476 UP/mg proteină. Factorul de purificare a fost 3,17 (tabelul 15.17).

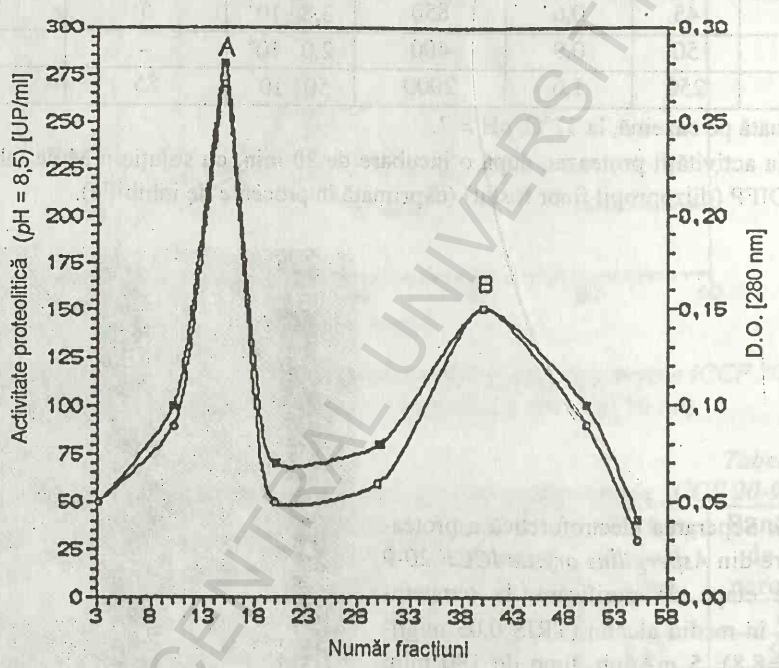


Fig. 15.17. Diagrama de eluție a proteazelor alcaline din *Aspergillus oryzae* de pe CM-celuloză.

Tabelul 15.17

Etapele purificării proteazelor alcaline din *Aspergillus oryzae 20-9*

Fracțiunea	Volum, [ml]	Proteină, [mg/ml]	Activitate totală		Activitate specifică* [UP/mg]	Factor de purificare	Randament de recuperare [%]
			*p*H = 7	*p*H = 8,5			
1	2	3	4	5	6	7	8
Extract brut	800	2	$32 \cdot 10^4$	$24 \cdot 10^4$	150	1	100
Ultrafiltrare	200	4,5	$31 \cdot 10^4$	$22 \cdot 10^4$	244	1,62	91

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 15.17 (continuare)

1	2	3	4	5	6	7	8
Precipitare cu acetonă (pp II)	50	8	$23 \cdot 10^4$	$16 \cdot 10^4$	400	2,66	72
Adsorbție pe CM-celuloză	70	3	$3 \cdot 10^4$	$10 \cdot 10^4$	476	3,17	62

* Estimată la *p*H = 8,5, ignorând contaminarea la *p*H = 7.

Tabelul 15.18

Cromatografia pe CM-celuloză a proteazelor din *Aspergillus oryzae ICCF 20-9*

Fracții de pe CMC	Volum [ml]	Proteină [mg/ml]	Activitate proteazică* [UP/ml]	Activitate totală [UP]	Inhibiție ** [10^{-3} M EDTA]	Inhibiție ** [10^{-3} M DIFP]
A	70	3	143,1	$10 \cdot 10^4$	20	90
B	40	1,2	2	$80 \cdot 10^4$	30	70

* Estimată la *p*H = 8,5.

** Inhibiția activității proteazei după o incubare 30 min cu 1 mM inhibitor (în procente de inhibiție).

Analiza activității enzimatice precum și studiile de inhibiție efectuate asupra celor două maxime din curba de eluție au demonstrat proprietățile specifice de protează alcalină serinică a preparatului enzimatic purificat.

Caracterizarea proteazei alcaline izolate, prin cromatografie pe CM-celuloză s-a efectuat prin metoda disc-electroforezei. Enzima s-a dovedit a fi omogenă din punct de vedere electroforetic (fig. 15.18).

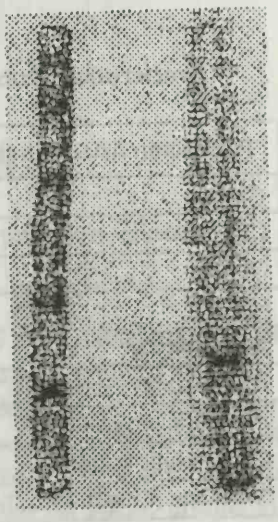


Fig. 15.18. Separarea electroforetică a proteazelor alcaline din *Aspergillus oryzae ICCF 20-9* – temperatura 25°C, mediu alcalin (TRIS 0,05 m/glicocol *p*H = 8,8), 5 mA/tub, 180 min: *A* – extract inițial brut; *B* – eluat de pe CM-celuloză, *fracția A*.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Masa moleculară a proteazei alcaline purificate, determinată prin metoda gel-filtrării, a fost de 29 kDa, în concordanță cu datele din literatura de specialitate care indică pentru proteazele alcaline serinice mase moleculare cuprinse între 25 și 30 kDa.

Obținerea unor preparate farmaceutice cu activitate enzimatică proteolitică. În vederea obținerii de medicamente active în tratamentul plăgilor necrotice sau în tratamente digestive este necesară extracția, purificarea și caracterizarea proteazelor din lichidul extracelular produs de tulpini de *Aspergillus oryzae*, indicate în acest scop.

Produsul enzimatic obținut, condiționat corespunzător, se folosește la îndepărtarea cheagurilor de fibrină, sfacelelor înaintea aplicării cicatrizantelor în tratamentul plăgilor. Principiul activ al acestui produs este constituit din complexul enzimatic proteolitic capabil să hidrolizeze, la *p*H fiziologic, diferite proteine existente în plăgi, permițând astfel îndepărtarea rapidă a acestora și aplicarea cicatrizantelor pe o rană bine curățată.

În scopul obținerii unui astfel de produs farmaceutic, colectivul ICCF a apelat la tulpina *Aspergillus oryzae20-9* cultivată timp de 48 de ore la 30°C, în bioreactoare tip Ultroferm 1601 LKB-Suedia, în condiții de aerare și agitare pe mediul cu lactoză.

Extractul brut obținut după separarea prin filtrare a miceliului de *Aspergillus oryzae 20-9* s-a supus operațiilor de izolare și purificare a complexului proteolitic după un protocol descris în figura 15.19. Procedeul aplicat a condus la obținerea unui preparat enzimatic cu activitate proteolitică de 1,2 UP^{FIP}/mg (unități proteazice standardizate de Federația Internațională de Farmacie, exprimate în micromoli tirozină /min).

Produsul finit s-a condiționat sub formă de pulbere liofilizată, caracteristicile fizico-chimice fiind prezentate în tabelul 15.19.

Tabelul 15.19

Caracteristicile fizico-chimice ale preparatului enzimatic farmacologic-activ în tratamentul plăgilor

Proprietăți fizico-chimice și biochimice	Condiții de admisibilitate
Aspect	Pulbere amorfă
Culoare	Alb-gri
Miros	Slab caracteristic
Gust	Slab amar
Solubilitatea	Solubil în apă și ser fiziologic
Pierdere prin uscare	Maximum 6%
Activitate proteolitică	Minimum 1 UP^{FIP}/mg
Concentrație proteică	Minimum 0,25 mg/mg preparat
Sterilitate (Cf. FR.X)	Steril

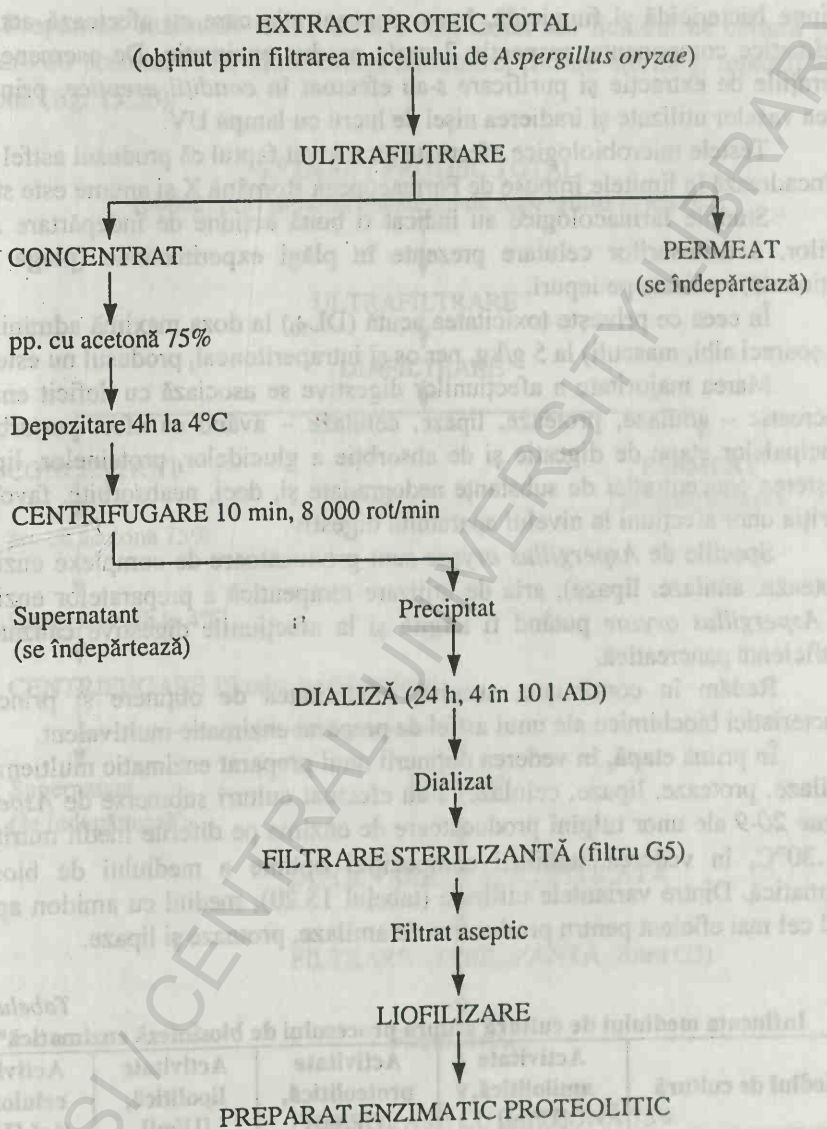


Fig. 15.19. Izolarea şi purificarea unui preparat enzimatic proteolitic utilizat în tratamentul plăgilor necrotice.

Originea fungică precum şi utilizarea produsului în tratamentul plăgilor deschise a impus un control microbiologic riguros al preparatului obținut.

Din acest motiv, în vederea eliminării posibilităților de contaminare suplimentară, *înainte de faza de ultrafiltrare*, în soluția perfect limpede rezultată după faza de filtrare s-a adăugat fenol în raport de 5 mg/1000 ml soluție enzimatică; *înainte de faza de liofilizare* s-a adăugat mertiolat de sodiu, produs cu

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

acţiune bactericidă şi fungicidă, într-o concentraţie care nu afectează activităţile enzimatice componente, respectiv 2 mg/g produs enzimatic. De asemenea, toate operaţiile de extracţie şi purificare s-au efectuat în *condiţii aseptice*, prin sterilizarea vaselor utilizate şi iradierea nişei de lucru cu lampă UV.

Testele microbiologice efectuate au relevat faptul că produsul astfel obţinut se încadrează în limitele impuse de Farmacopeea Română X şi anume este steril.

Studiile farmacologice au indicat o bună acţiune de îndepărtare a cheagurilor, a dritusurilor celulare prezente în plăgi experimentale (plagă arsă şi secţionată) realizate pe iepuri.

În ceea ce priveşte toxicitatea acută (DL_{50}) la doza maximă administrabilă (pe şoareci albi, masculi) la 5 g/kg, per os şi intraperitoneal, produsul nu este toxic.

Marea majoritate a afecţiunilor digestive se asociază cu deficit enzimatic pancreatic – amilaze, proteaze, lipaze, celulaze – având ca efect perturbări ale principalelor etape de digestie şi de absorbţie a glucidelor, proteinelor, lipidelor. Creşterea concentraţiei de substanţe nedegradate şi, deci, neabsorbite, favorizează apariţia unor afecţiuni la nivelul aparatului digestiv.

Speciile de *Aspergillus oryzae* sunt producătoare de complexe enzimatice (proteaze, amilaze, lipaze), aria de utilizare terapeutică a preparatelor enzimatice din *Aspergillus oryzae* putând fi lărgită şi la afecţiunile digestive cauzate de o insuficienţă pancreatică.

Redăm în continuare, succint, modalitatea de obţinere şi principalele caracteristici biochimice ale unui astfel de preparat enzimatic multivalent.

În prima etapă, în vederea obţinerii unui preparat enzimatic multienzimatic (amilaze, proteaze, lipaze, celulaze) s-au efectuat culturi submerse de *Aspergillus oryzae 20-9* ale unor tulpini producătoare de enzime pe diferite medii nutritive, la 29...30°C, în vederea stabilirii compoziţiei optime a mediului de biosinteză enzimatică. Dintre variantele utilizate (tabelul 15.20), mediul cu amidon apare ca fiind cel mai eficient pentru producerea de amilaze, proteaze şi lipaze.

Tabelul 15.20

Influenţa mediului de cultură asupra procesului de biosinteză enzimatică*

Mediul de cultură	Activitate amilolitică, [U/ml]	Activitate proteolitică, [UP/ml]	Activitate lipolitică, [U/ml]	Activitate celulozolitică [U/ml]
Făină de soia 2%, amidon 1,5 %	60	200	0,3	1,6
Făină de soia 2,5%, lactoză 1,5 %	20	300	0,21	1,2
Făină de soia 2,5%, glucoză 1 %	22	250	0,24	0,0

* Compoziţia mediului de cultură, %: făină de soia – 2; amidon solubil – 1,5; tărâţe de grâu – 0,5; fosfat monopotasic – 2,7; sulfat de magneziu – 0,012; micropilot (bioreactoare de 14 l încărcate cu 8 l mediu de cultură).

Preparatul enzimatic multivalent a fost izolat din lichidul de cultură prin precipitare cu acetonă 75%, ultrafiltrare, diafiltrare, filtrare sterilă și reprecipitare cu acetonă (fig. 15.20).

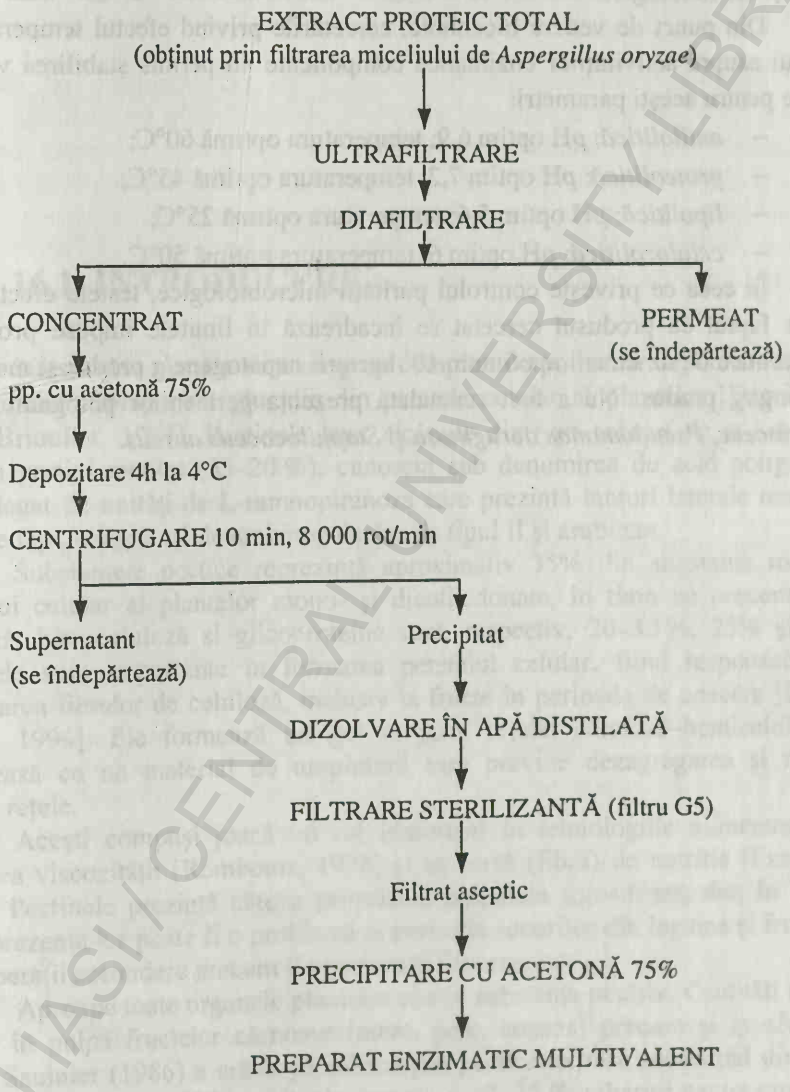


Fig. 15.20. Obținerea unui preparat enzimatic multivalent utilizat în tratamentele digestive.

Preparatul multienzimatic, astfel obținut, prezintă următoarele activități enzimatice:

- *amilolitică*: 623 UE/g;
- *proteolitică*: 100 000 UP/g;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- *lipolitică*: $3,2 \cdot 10^{-3}$ UE/g;
- *celulozolitică*: 17,4 UE/g.

Preparatul multienzimatic se prezintă sub formă de pulbere alb-gri, solubil în apă şi ser fiziologic.

Din punct de vedere biochimic, cercetările privind efectul temperaturii şi *p*H-ului asupra activităţilor enzimatice componente au permis stabilirea valorilor optime pentru aceşti parametri:

- *amilolitică*: *p*H optim 6,9; temperatura optimă 60°C;
- *proteolitică*: *p*H optim 7,2; temperatura optimă 45°C;
- *lipolitică*: *p*H optim 5,6; temperatura optimă 25°C;
- *celulozolitică*: *p*H optim 6; temperatura optimă 50°C.

În ceea ce priveşte controlul purităţii microbiologice, testele efectuate au relevat faptul că produsul cercetat se încadrează în limitele impuse produselor farmaceutice de uz uman: maximum 10^4 bacterii nepatogene/g produs şi maximum 10^2 fungi/g produs. Nu a fost semnalată prezenţa germenilor patogeni *Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa* şi *Staphilococcus aureus*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

16. ENZIME PECTINOLITICE

16.1. INTRODUCERE

Substanţele pectice sunt un grup complex de polizaharide, constituind cel mai abundent component glucidic din peretele celular al plantelor [Darvill ş.a., 1980, Brioullet, 1987]. Pectinele sunt alcătuite dintr-un schelet de α-1,4-galacturonan parţial metilat (15–20 %), cunoscut sub denumirea de acid poligalacturonic, legat de unităţi de L-ramnopiranoza care prezintă lanţuri laterale neutre ce sunt, de fapt, complecşi de arabinogalactan de tipul II şi arabinan.

Substanţele pectice reprezintă aproximativ 35% din substanţa uscată a peretelui celular al plantelor mono- şi dicotiledonate, în timp ce procentele de celuloză, hemiceluloză şi glicoproteine sunt, respectiv, 20–30 %, 25% şi 20%. Pectinele sunt importante în formarea peretelui celular, fiind responsabile cu cimentarea fibrelor de celuloză, inclusiv la fructe în perioada de coacere [Rees şi Wight, 1996]. Ele formează un gel în jurul reţelei celuloză–hemiceluloză şi acţionează ca un material de umplutură care previne dezagregarea şi ruperea acestei reţele.

Aceşti compuşi joacă un rol important în tehnologiile alimentare prin creşterea vîscozităţii [Rombouts, 1978] şi ca sursă (fibră) de nutriţie [Eastwood, 1990]. Pectinele prezintă câteva proprietăţi coloidale folositoare, dar, în acelaşi timp, prezenţa lor poate fi o problemă la extracţia sucurilor din legume şi fructe, ca şi în operaţii secundare precum limpezirea şi filtrarea.

Aproape toate organele plantelor conţin substanţe pectice. Cantităţi mari se găsesc în pulpa fructelor cărnoase (mere, pere, ananas) precum şi în sfecla de zahăr. Saulnier (1986) a arătat că substanţele pectice extrase secvenţial din pulpa strugurilor conţin 44–63 % acid galacturonic şi 17–25 % zaharuri neutre cum ar fi: arabinoza (3,5–10,4 %), galactoza (3,4–12,2 %), ramnoza (3–5,8 %), xiloza (0,6–2,4 %) şi cantităţi minore de glucoză (0,3–1,3 %) şi manoză (0,1–0,9 %). Pentru majoritatea fructelor (roşii şi albe) raportul molar dintre arabinoză şi galactoză este cuprins între 0,91 şi 1,04. Ramnoza, punctul de inserţie al lanţurilor laterale, este mult mai abundentă în pectinele strugurilor decât în alte fructe,

precum cireşele, merele şi citricele. În cazul acestor fructe substanţele pectice prezintă grade înalte de esterificare şi de metoxilare (68–77 %), cu un grad de acetilare mai scăzut decât cel din caise sau sfecla de zahăr (2,0–5,1 %). În ceea ce priveşte masa moleculară a pectinelor din struguri, Saulnier (1987) a situat-o în jurul mediei de 40 kDa, cu variaţii mici între diferitele fracţii (39,2–44,9). În comparaţie cu cea a altor fructe, precum cireşele şi merele, aceasta este mai scăzută.

Substanţele pectice din fructe joacă un rol important pe parcursul tehnologiei de obţinere a sucurilor în funcţie de localizarea lor histologică şi de solubilitate. Pectinele solubile din pulpă au un efect negativ asupra extracţiei sucului şi asupra timpului de limpezire a acestuia. Pectinele insolubile din pulpă şi epidermă, în anumite condiţii de prelucrare (la temperaturi mai ridicate) conduc la creşterea viscozităţii şi la scăderea filtrabilităţii sucurilor, dar au un efect benefic asupra calităţilor organoleptice ale sucurilor.

Pectinele pot fi degradate de către enzimele pectinolitice, clasificate în pectinesteraze, poligalacturonaze şi pectin şi pectat liaze. Punctele de atac ale enzimelor pectinolitice sunt prezentate în figura 16.1.

Enzimele pectinolitice sunt sintetizate numai de plante şi microorganisme, celulele animale nedispunând de astfel de enzime.

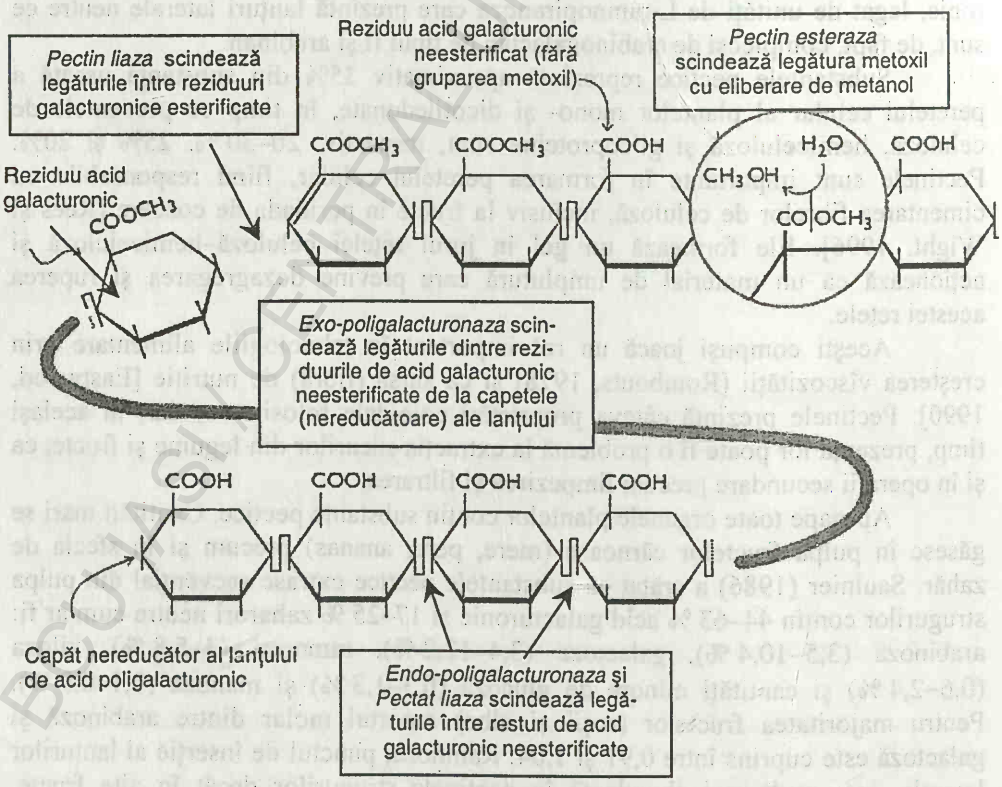


Fig. 16.1. Degradarea substanţelor pectice de către enzimele pectinolitice.

Cele dintâi informaţii ştiinţifice asupra enzimelor pectinolitice datează din mijlocul secolului trecut [Kertesz, 1951] când apar primele referate ştiinţifice privind procesele de degradare ale pectinei din unele legume (de exemplu din morcovi) sau în procesele de macerare ale tulpinilor de in. Cercetările efectuate ulterior au dus la evidenţierea importanţei practice a acestor enzime pentru diferite sectoare ale industriei alimentare ca, de exemplu, industria de sucuri, vinificaţiei, ceaiului, boabelor de cafea şi cacao. Mai pot fi utilizate şi în industria textilă la topirea plantelor textile, ca inul şi cânepa.

16.2. CLASIFICAREA ŞI CARACTERIZAREA ENZIMELOR PECTINOLITICE

În prezent, pe baza amplelor studii efectuate asupra complexelor enzimatice pectinolitice din diferite surse, acestea pot fi clasificate în funcţie de natura legăturii atacate în două grupe:

- enzime de demetoxilare;
- enzime de depolimerizare.

a) ***Enzimele de demetoxilare*** sunt esteraze care catalizează demetoxilarea pectinei eliberând metanol. În mod uzual sunt denumite pectinesteraze, pectinmetilesteraze, pectindemetoxilaze, de unde şi prescurtarea utilizată în mod curent de PME sau PE. Denumirea ştiinţifică, conform nomenclaturii stabilite de Comisia de Enzimologie (EC a IUB) este pectin-pectil-hidrolaza şi are codul EC 3.1.1.11.

Fremy, în 1840, a fost primul care a descoperit enzimele pectinolitice [Kertesz, 1951].

Pectinesterazele au fost identificate în diverse fructe sau legume ca, de exemplu, bananele, cireşele, castraveţii, coacăzele, papaia, perele, merele, tomatele, căpşunele, strugurii, citricele, piersicile. În ţesuturile vegetale PME sunt puternic absorbite pe componentele tisulare insolubile în apă [Manjon ş.a., 1992].

Specificitatea pectinesterazei din plante este aproape absolută pentru metilesterii poliuronidelor. Astfel, nu acţionează asupra esterilor etilici, ai glicerolului, ai acizilor acetic şi tartric.

b) ***Enzime depolimerizante.*** Enzimele de depolimerizare sunt α-glicozidaze ce acţionează asupra lanţurilor poligalacturonice hidrolizând legăturile α-1,4-glicozidice, afectând astfel gradul de polimerizare.

După ultimele clasificări, aceste enzime pot hidroliza legăturile α-1,4-glicozidice dintre două reziduuri de acid galacturonic nemetilate şi, în acest caz, se numesc poligalacturonaze. Pectin şi pectat liazele catalizează β-eliminarea între două reziduuri galacturonice metilate sau nemetilate (fig. 16.1).

Poligalacturonaza (EC 3.2.1.15) este larg răspândită în regnul vegetal şi este produsă de diferite microorganisme saprofite sau fitopatogene în vederea degradării ţesuturilor vegetale. Astfel, a fost identificată în pere, piersici, citrice, tomate, castraveţi, ananas, mere, în plante erbacee şi este produsă de microorganisme din genul *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Erwinia* etc.

Cele mai studiate sunt cele produse de microorganisme şi anume, de fungi, deoarece acestea sunt cele utilizate în mod curent pentru obţinerea de preparate enzimatice pectinolitice industriale.

Conform recomandărilor din *Enzyme Nomenclature* (1984) şi după clasificarea propusă de Whitaker (1990) enzimele pectinolitice sunt de trei tipuri, şi anume: esteraze, poligalacturonaze şi liaze (tabelul 16.1).

Tabelul 16.1

Clasificarea enzimelor pectinolitice

Denumire recomandată	Nr. EC	Denumire sistemică	Alte denumiri
Esteraze			
Pectinesteraza	3.1.1.1	Pectin pectilhidrolaza	Pectin demetoxilaza Pectin metoxilaza Pectin metilesterza
Poligalacturonaze			
Protopectinaza	–	–	–
Endopoligalacturonaza	3.2.1.15	Poli(1,4-α-D-galacturonid) glicanohidrolaza	Pectinaza
Exopoligalacturonaza	3.2.1.67	Poli(1,4-α-D-galacturonid) galacturonohidrolaza	Poli (galacturonat)hidrolaza
Exo-poli-α-galacturonidaza	3.2.1.82	Poli(1,4-α-D-galactozid) digalacturonohidrolaza	Digalacturonat hidrolaza
Oligogalacturonat hidrolaza	–	–	–
Endopolimetilgalacturonaza	–	–	–
Liaze			
Pectat liaza	4.2.2.2	Poli (1,4-α-D-galacturonid) liaza	Endopectat liaza
Exopoligalacturonat hidrolaza	4.2.2.9	Poli (1,4-α-D-galacturonid) liaza	Exopectat liaza
Pectin liaza	4.2.2.10	Poli (metoxigalacturonid) liaza	Endopectin liaza
Oligogalacturonat liaza	4.2.2.6	Oligo (D-galacturonid) liaza	–

Sursele de izolare ale enzimelor pectinolitice. Enzimele pectinolitice au fost izolate atât din plante superioare, cât şi din microorganisme. Prezenţa lor a fost semnalată şi în larvele unor insecte (ploşniţa verde, gărgăriţa orezului).

Cele de origine vegetală sunt implicate în elongaţia celulelor şi pe parcursul coacerii, maturării şi stocării fructelor, fiind responsabile de înmuierea acestora. Din organele plantelor au putut fi izolate enzimele din grupele endopoligalacturonazelor, exopoligalacturonazelor şi pectinesterazelor. Nu au fost izolate enzime din grupa pectat sau pectin liazelor. Până în prezent au fost publicate date referitoare la extracţia şi caracterizarea enzimelor pectinolitice de la următoarele fructe şi legume: roşii, cireşe, piersici, portocale, grapefruit, papaia, mango, soia, in, măsline.

Una din grupele de microorganisme mari producătoare de enzime pectinolitice este cea a agenţilor patogeni ai plantelor, fie că sunt fungi, fie că sunt bacterii. În urma infectării sistemice a plantelor, aceste microorganisme produc un amestec de enzime cu acţiune sinergică ce vor degrada polimerii pectici.

16.3. MICROORGANISME PRODUCĂTOARE DE ENZIME PECTINOLITICE

Pornind de la studiile efectuate asupra microorganismelor ca agenţi patogeni ai plantelor, au fost efectuate cercetări asupra altor microorganisme producătoare de enzime pectinolitice. Au fost izolate, purificate şi caracterizate enzime pectinolitice de la toate grupurile de microorganisme, fungi filamentoşi, bacterii şi drojdii.

Clasa fungilor, prin specia *Aspergillus*, poate fi considerată ca cea mai mare producătoare de enzime pectinolitice, producând exo- şi endopoligalacturonaze. Specia *Aspergillus niger* s-a dovedit a produce multiple forme moleculare în funcţie de substrat şi condiţiile de cultură, uneori producând şi pectinesteraze, pectat şi pectin liaze [Dinu, 1998]. Poligalacturonaza din specia *Aspergillus kawachii* s-a dovedit a avea o activitate remarcabilă chiar şi în condiţii acide, la *p*H = 2.

Principalele microorganisme utilizate pentru obţinerea de pectinmetilesteraze sunt: *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Xantomonas campestri*, *Xantomonas vascularum*, *Penicillium chrysogenum*, *Coaticium rolfii*.

Poligalacturonazele sunt produse de specii precum: *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus arrhizus*, *Rizoctonia fragariae*, *Trichoderma koningii*, *Saccharomyces fragilis*, *Erwinia carotovora*.

Echipamentul enzimatic al bacteriilor este diferit de cel al fungilor, cele dintâi degradând substanţele pectice prin intermediul pectat liazelor, iar fungii cu ajutorul pectin liazelor.

Una din bacteriile cele mai studiate cu privire la producerea de enzime pectinolitice este *Erwinia chrysanthemi*. Echipamentul său enzimatic este foarte complex, în el fiind implicate două pectinmetilesteraze (PemA şi PemB), două pectinacetilesteraze (PaeX şi PaeY), opt endopectat liaze (PelA, PelB, PelC, PelD, PelE, PelI, PelL şi PelZ), două exo-pectat liaze (PelX şi PelZ) şi trei exo-poligalacturonaze (PehX, PehV şi PehW) [Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2002]. În prezent se efectuează studii asupra mecanismului transcripţional al virulenţei acestei bacterii.

Activitatea pectinolitică este relativ rară în rândul drojdiilor. Producţia de poligalacturonază a fost raportată la specii precum *Trichosporon penicillatum*, *Kluyveromyces marxianus* şi *Kluyveromyces wickerhamii* [Iguchi, 1996; Sienkstele, 1999; Yoshitake, 1994], *Candida boidii* [Nakagawa, 2000]. *Trichosporon penicillatum* produce trei poligalacturonaze care au capacitatea de a pune în libertate pectinele hidrosolubile din protopectine. Genele ce codifică aceste trei enzime au fost deja clonate de către Iguchi, în 1997.

O tulpină de laborator de *Saccharomyces cerevisiae* a fost izolată având activitate poligalacturonazică. Această tulpină prezintă gena activa *PSM1* şi/sau *PGU1* care, de obicei, este represată la drojdii [Hirose, 1998]. Hirose, în 1999, a obţinut o mutantă înalt producătoare de poligalacturonază din tulpina de laborator. Gena codantă a fost localizată pe cromozomul X şi are o lungime de 1086 perechi de baze. Această genă a fost pusă în evidenţă şi la drojdii industriale, poliploide, dar mecanismul represării acesteia nu a fost încă elucidat. Prezenţa în mediu a galactozei şi a acidului poligalacturonic induce activitatea poligalacturonazică la specia *Saccharomyces*, ceea ce dovedeşte că activitatea pectinolitică este dependentă de sursa de carbon din mediu [Rădoi, 2001].

Tehnicile moderne ale ingineriei genetice au permis obţinerea unor tulpini de microorganisme înalt producătoare de enzime pectinolitice. Principala sursă de gene codante este specia care produce şi în mod natural cele mai mari cantităţi de enzime pectinolitice, şi anume *Aspergillus niger*.

16.4. METODOLOGIA GENERALĂ DE PRODUCERE A ENZIMELOR PECTINOLITICE INDUSTRIALE

Interesul manifestat de diferite ţări pentru producerea de preparate enzimatice pectinolitice datează încă din 1935. O serie de firme producătoare furnizează în prezent astfel de preparate enzimatice sub diverse denumiri: Pectinol, Pektasin, Filtrajol, Filtrazym, Rohamet, Ultrazym, Macerozym, Pectinex, Pectofoetidin etc. La

noi în țară s-a produs în condițiile stabilite de Ilie Vasilescu (prin cultură de suprafață) un preparat pectinolitic brut, denumit inițial Aspergol, iar mai târziu Linpectin.

Produsul obținut în cadrul Întreprinderii Terapia Cluj-Napoca, pe un mediu cu tărâțe de grâu și felii de morcov, avea o granulație variabilă, culoare gri-cenușie până la negru și miros de „mucegai". Toate acestea alcătuiau o serie de dezavantaje, situând produsul în zona produselor necompetitive și ineficiente, ceea ce a determinat orientarea celor interesați spre obținerea acestor preparate în condiții submerse.

O metodă de obținere a enzimelor pectinolitice în condiții submerse este cea care folosește ca microorganism producător o tulpină de *Aspergillus niger* cultivată pe un mediu lichid. Inoculul se poate obține fie prin biosinteza de suprafață pe medii solide, fie prin metode submerse [Pele și colab, 1998]. După inoculare, dezvoltarea se realizează la vibroterm, în flacoane agitate, cu menținerea unui *p*H de 4,8–6,0, la o temperatură de 28–30°C. Biomasa rezultată este un inocul care poate fi direct folosit pentru inocularea mediilor de producție.

Deși pentru utilizarea în industria agroalimentară nu necesită un grad ridicat de purificare, enzimele pectinolitice comerciale fac obiectul unei stricte reglementări privind producția lor, puritatea biochimică și puritatea miocrobiologică.

La ora actuală sursa vegetală este aproape total înlocuită prin utilizarea biotehnologiilor ce fac apel la microorganisme producătoare de enzime pectinolitice.

Microorganismele utilizate pentru obținerea de enzime destinate industriei alimentare nu trebuie să fie nici patogene, nici toxicogene (tabelul 16.2).

Tabelul 16.2

Criterii de puritate chimică, biologică și microbiologică ale preparatelor enzimatice pentru industria alimentară

Criteriu de puritate	Limita admisă
Cadmiu Cd	Maxim 0,5 mg/kg
Mercur Hg	Maxim 0,5 mg/kg
Arsen As	Maxim 3 mg/kg
Plumb Pb	Maxim 10 mg/kg
Aflatoxine	Maxim 0,005 mg/kg
Germeni totali	Maxim 50 000 ger/g
Salmonella	Absent în 25 mg produs
Pseudomonas aeruginosa	Absent în 1 g produs
Activitate antibiotică	Absentă

16.4.1. Întreținerea și conservarea tulpinilor

La stabilirea mediului de cultură trebuie avută în vedere, dacă este cazul, necesitatea prezenței inductorului și posibilitatea represiei catabolice a producției de enzime de către unii din componenți. În culturile de producție ale enzimelor pectinolitice inductorul utilizat, pectina, în concentrație mai ridicată (0,6–1,6 %) duce la inhibarea procesului de biosinteză. În general, ca surse de carbon și azot se utilizează unele subproduse ca: tărâțe de grâu, hidrolizat de porumb, amidon din porumb, șrot din soia, cazeină, drojdie de bere etc.

Sărurile se adaugă ca supliment de azot, activatori și pentru reglarea presiunii osmotice în membranele celulare.

Genul cel mai utilizat în producerea industrială a enzimelor pectinolitice fiind *Aspergillus*, mediul uzual de întreținere este mediul Czapek-Dox.

Mediul standard Czapek-Dox

$NaNO_3$	2,0 g
KCl	0,5 g
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,5 g
K_2HPO_4	1,0 g
$FeSO_4 \times 7H_2O$	0,01 g
Agar	15,0 g
Zaharoză	30,0 g
Pectină	10,0 g
Apă distilată	1000 ml

Un alt mediu de evidențiere și întreținere a microorganismelor producătoare de enzime pectinolitice este mediul CGA cu următoarea compoziție:

Mediul CGA

Cartofi curățați	250,0 g
Glucoză	20,0 g
Agar	20,0 g
Apă distilată	1000 ml

Pentru conservare se recomandă liofilizarea utilizând mediul ZG (zahăr–gelatină). Speciile *Aspergillus* fiind, în general, specii abundent sporulante, au o mai mare rezistență în timp, astfel că pot fi păstrate și sub ulei de parafină steril sau sub polietilenglicol 10%, sterilizat la 120°C, timp de 30 minute. Repicarea în ultimul caz se face o dată la 6 luni.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

16.4.2. Prepararea inoculului

Tulpina liofilizată se regenerează prin suspendarea sterilă a depozitului dintr-o fiolă în 0,5–1 ml bulion simplu şi trecerea unei picături în eprubete cu mediu înclinat cu geloză sau CGA. Se incubează la 30°C, timp de 5–7 zile. Culturile pure se păstrează în frigider sau sub ulei de parafină.

Tulpina producătoare se multiplică în vederea obţinerii inoculului fie în cutii Petri, fie în flacoane Erlenmeyer în mediu similar cu cel utilizat la biosinteza propriu-zisă.

Cultura preinocul obţinută în 72 ore de dezvoltare statică este raclată cu perle sterile şi suspendată în ser fiziologic, în vederea obţinerii unei suspensii a cărei densitate optică să fie 0,2–0,3 (la Spekol în cuvă de 1 cm^3, la 570 nm lungime de undă). Această densitate corespunde unei concentraţii de 10^5 spori/ml. Această suspensie este utilizată 1% la prepararea inoculului.

Inoculul propriu-zis este reprezentat de o cultură submersă dezvoltată 48 ore pe un agitator, în flacoane Erlenmeyer ce conţin 100 ml mediu, preparat după aceeaşi formulă cu a mediului de producţie şi sterilizat 20 de minute la 120°C.

Inoculul trebuie să reprezinte 5–10 % din mediul de cultură al bioreactorului.

În general, mediul pentru inocul trebuie să conţină surse asimilabile de carbon şi azot, în compoziţie intrând următoarele ingrediente:

Tescovină de mere	40,0 g
Melasă	15,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	40,0 g
$(NH_4)_2HPO_4$	0,7 g
$CaCO_3$	4,0 g
Apă distilată	1000 ml

16.4.3. Faza de bioproces

Biosinteza propriu-zisă se realizează în bioreactoare de diferite capacităţi (50–100 l), prevăzute cu un sistem de agitare de tip disc–turbină cu palete plane la 45°.

Pe parcursul bioprocesului se aplică diferite regimuri de aerare şi agitare. Variaţia parametrilor de agitare–aerare este dictată atât de evoluţia oxigenului dizolvat rezidual, care este menţinut la valori relativ mari, cât şi de creşterea vâscozităţii ca urmare a dezvoltării abundente a biomasei, impunând intensificarea agitării pentru o amestecare eficace.

Mediul de cultură cel mai indicat pentru producerea de enzime pectinolitice s-a dovedit a fi cel cu tescovină de mere ca sursă de pectină. La mediile lichide adaosul de melasă conduce la creşterea substanţială a activităţii pectinolitice [Pele, 1996]. Frecvenţa infecţiilor apărute în faza de bioproces a impus reguli mai severe de sterilizare. Astfel, la un bioreactor de 90 l, sterilizarea mediului se

realizează timp de 2 ore la 130°C, iar pentru vas este necesară tindalizarea (prima etapă timp de 1 oră la 120°C, iar a doua timp de 1 oră la 130°C, la 24 ore după prima) [Pele, 1996].

Microorganismul utilizat fiind un fung, acesta va forma la suprafață o pânză micelianǎ, în raport cu gradul de aerobioză. De aceea, este important ca în timpul bioprocesului să se asigure condiții fiziologice specifice, omogene de cultivare prin agitare mecanică și aerare controlată. Temperatura de lucru este de 20...30°C, pe o durată de 72–78 ore, când se ajunge la o activitate enzimatică de 17–18 UE/ml.

16.4.4. Extracția și izolarea enzimelor pectinolitice

O dată procesul de biosinteză finalizat, se trece la prelucrarea mediului de cultură. În cazul proceselor pe mediu solid se efectuează un proces de extracție prin omogenizare și agitare timp de 2 ore cu apă în proporție de 1 la 4. Îndepărtarea particulelor grosiere, fine și a sporilor se realizează în mai multe etape.

În prima fază se vor îndepărta particulele grosiere prin filtrare prin pânza de filtru sau prin centrifugare la 1000 g. Apoi, pentru obținerea unui lichid limpede, fără particule, se trece la o filtrare pe strat adjuvant (perlit, celită) sau o centrifugare la 3000–4000 g.

16.4.5. Purificarea preparatelor enzimatice pectinolitice

Pentru industria sucurilor nu este necesar ca preparatele enzimatice să fie de o puritate ridicată, dar, în schimb, trebuie să fie lipsite de germeni, particule străine și substanțe toxice sau metale grele.

Purificarea parțială a lichidelor obținute se poate realiza prin filtrare pe filtru *nutsche* cu suprafață de 0,8 m^2, cu o viteză de filtrare de 30–40 $l/m^2 \cdot h$ [Pele, 1996]. Datorită stratului de miceliu ce se depune pe filtru se recomandă utilizarea unui filtru tip presă, cu adaos prealabil de adjuvant în mediu, sau chiar a unui filtru rotativ cu vid, cu regenerare continuă. În aceste condiții randamentele ajung la 85–95 % în filtrat activ.

16.4.6. Condiționarea preparatelor cu activitate pectinolitică

Concentrarea se poate realiza prin ultrafiltrare prin membrane tip Millipore cu randament de 99%, prin precipitare cu solvenți organici (mai puțin indicați și cu randamente scăzute de până la 70%) sau sub vid cu randament ridicat (peste 95%) la 30...35°C. Există rezultate de concentrare și prin dializă față de glicerină și zahăr cu randamente de 96–97 %, dar materialul auxiliar este prea scump [Pele, 1996].

16.4.7. Fluxul tehnologic de obținere a enzimelor pectinolitice

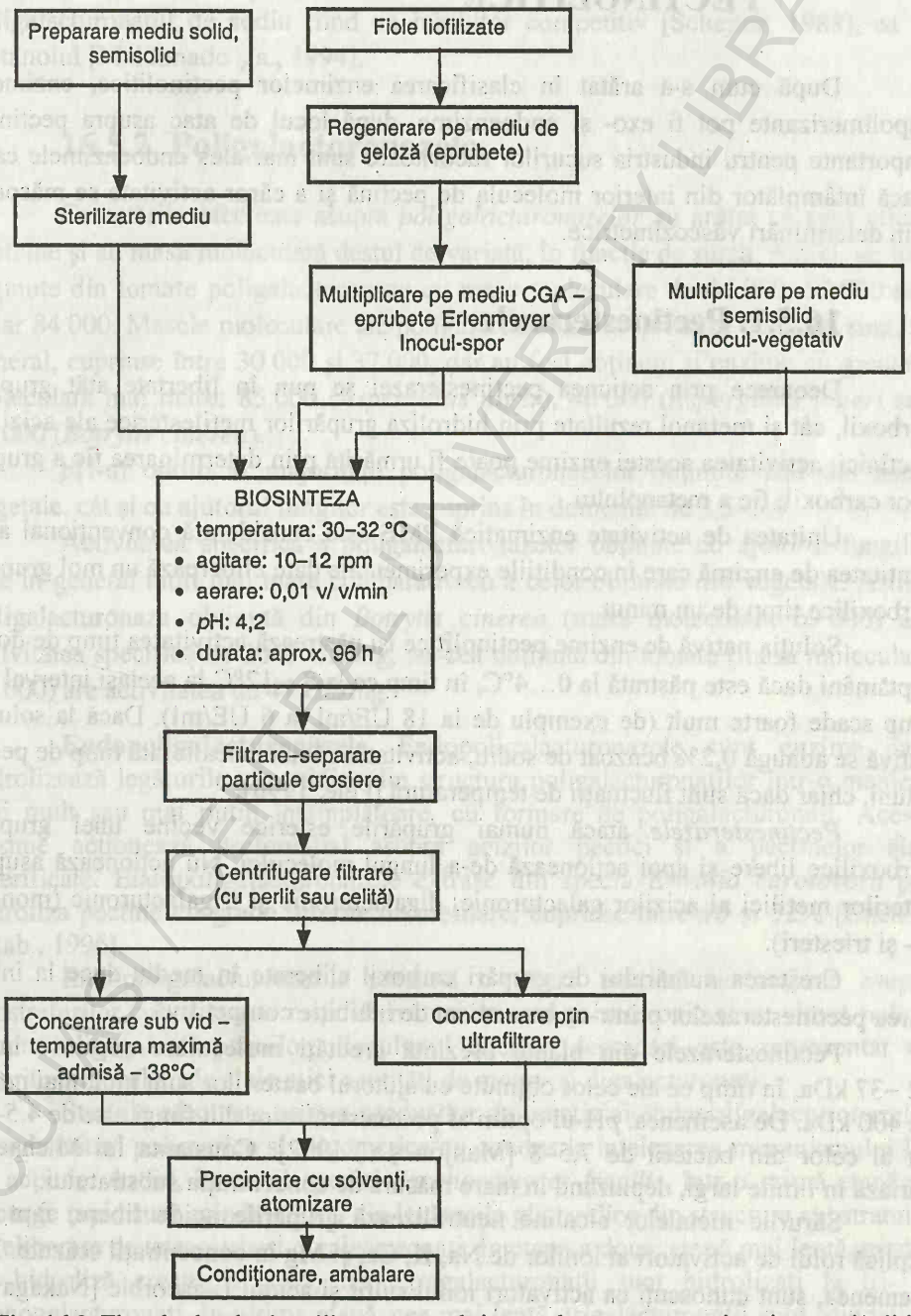


Fig. 16.2. Fluxul tehnologic utilizat pentru obținerea de preparate enzimatice pectinolitice prin culturi submerse pe medii semisolide (după Pele, 1996).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

16.5. CARACTERISTICILE FIZICO-CHIMICE ŞI BIOCHIMICE ALE ENZIMELOR PECTINOLITICE

După cum s-a arătat în clasificarea enzimelor pectinolitice, enzimele depolimerizante pot fi exo- şi endoenzime, după locul de atac asupra pectinei. Importante pentru industria sucurilor răcoritoare sunt mai ales endoenzimele care atacă întâmplător din interior molecula de pectină şi a căror activitate se măsoară prin determinări vâscozimetrice.

16.5.1. Pectinesterazele

Deoarece prin acţiunea pectinesterazei se pun în libertate atât grupări carboxil, cât şi metanol rezultate prin hidroliza grupărilor metilesterice ale acizilor pectinici, activitatea acestei enzime poate fi urmărită prin determinarea fie a grupărilor carboxil, fie a metanolului.

Unitatea de activitate enzimatică PME este considerată convenţional a fi cantitatea de enzimă care în condiţiile experimentale date eliberează un mol grupări carboxilice timp de un minut.

Soluţia nativă de enzime pectinolitice îşi păstrează activitatea timp de două săptămâni dacă este păstrată la 0...4°C, în timp ce la 8...12°C la acelaşi interval de timp scade foarte mult (de exemplu de la 18 UE/ml la 6 UE/ml). Dacă la soluţia nativă se adaugă 0,2% benzoat de sodiu, activitatea rămâne nealterată timp de peste 6 luni, chiar dacă sunt fluctuaţii de temperatură [Pele, 1996].

Pectinesterazele atacă numai grupările esterice vecine unei grupări carboxilice libere şi apoi acţionează de-a lungul moleculei. Nu acţionează asupra esterilor metilici ai acizilor galacturonic, digalacturonic şi trigalacturonic (mono-, di- şi triesteri).

Creşterea numărului de grupări carboxil eliberate în mediu duce la inhibarea pectinesterazelor printr-un mecanism de inhibiţie competitivă.

Pectinesterazele din plante prezintă greutăţi moleculare cuprinse între 22 –37 kDa, în timp ce ale celor obţinute cu ajutorul bacteriilor sunt mult mai mari, de 400 kDa. De asemenea, *p*H-ul optim al pectinesterazelor din fungi este de 4,5–5, iar al celor din bacterii de 7,5–8 [Manjon ş.a., 1992]. Constanta lui Michaelis variază în limite largi, depinzând în mare măsură de concentraţia substratului.

Sărurile metalelor alcaline neutralizează grupările acide libere, fapt ce explică rolul de activatori ai ionilor de Na, K, Ca, şi Mg în concentraţii scăzute. De asemenea, sunt cunoscuţi ca activatori ionul sulfit şi acidul L-ascorbic [Nakagawa ş.a., 1970].

Pectinesterazele sunt inhibate de: ioni de argint, clorură mercurică, clorură de cupru, clorură de aluminiu, iod, iodacetamida, glucide, polifenoli, detergenți. De asemenea, acidul poligalacturonic este un inhibitor al pectinesterazelor, poligalacturonatul de sodiu fiind un inhibitor competitiv [Schejter, 1988], ca și metanolul [Maldonado ș.a., 1994].

16.5.2. Poligalacturonazele

Cercetările efectuate asupra *poligalacturonazelor* au arătat că sunt glicoproteine și au masa moleculară destul de variată, în funcție de sursă. Astfel, au fost obținute din tomate poligalacturonaze cu mase moleculare de 44 000, 52 000 sau chiar 84 000. Masele moleculare ale poligalacturonazelor produse de fungi sunt, în general, cuprinse între 30 000 și 37 000, dar au fost obținute și enzime cu greutate moleculară mai mare: 85 000 (*Aspergillus niger*), 46 000 (*Aspergillus niger*) sau 69 000 (*Botrytis cinerea*).

*p*H-ul optim al majorității poligalacturonazelor obținute atât din surse vegetale, cât și cu ajutorul fungilor este cuprins în domeniul de 3,5–5,0.

Activitatea specifică a poligalacturonazelor obținute cu ajutorul fungilor este în general mult mai mare comparativ cu a celor obținute din vegetale. Astfel, poligalacturonaza obținută din *Botrytis cinerea* (masa moleculara 69 000) are activitatea specifică de 2049 UE/mg, iar cea obținută din tomate (masa moleculară 52 000) are activitatea de 47 UE/mg.

Endopoligalacturonazele. Endopoligalacturonazele sunt enzime care hidrolizează legăturile glicozidice din structura poligalacturonaților într-o manieră mai mult sau mai puțin întâmplătoare, cu formare de poligalacturonați. Aceste enzime acționează preferențial asupra acizilor pectici și a pectinelor slab esterificate. Endopoligalacturonazele extrase din specia *Erwinia carotovora* pot hidroliza pectine cu grade diferite de metilare, cuprinse între 16 și 52% [Chen și colab., 1996].

Endopoligalacturonazele prezintă o viteză maximă de acțiune asupra substraturilor cu un număr mare de resturi de acid galacturonic și cu viteză redusă asupra oligogalacturonanilor. Rezultatul acestor degradări este reprezentat de diferite oligozaharide și de mici cantități de mono- și digalacturonați.

Studiile efectuate asupra produșilor de reacție ai endopoligalacturonazelor pe substraturi polimerice și oligomerice au condus la înțelegerea mecanismului lor de acțiune. Astfel, în cazul speciei *Saccharomyces fragilis*, într-o primă etapă ce decurge rapid sunt scindate 25% din legăturile glicozidice din structura substratului cu eliberare de tetra-, tri- și digalacturonați. În etapa a doua, etapă mai lentă, gradul de hidroliză crește la 50%, iar tetragalacturonații sunt hidrolizați la tri- și monogalacturonați. În ultima etapă, cea mai lentă, trigalacturonații sunt scindați la digalacturonați și acid galacturonic.

Datorită modului de acţiune şi a specificităţii de substrat diferite, ce depind de natura situsului activ, s-a ajuns la concluzia că endopoligalacturonazele acţionează după trei modele diferite, respectiv posedând trei centre catalitice diferite [Rexova – Benkova, 1976]. Astfel sunt descrise modele *A*, *B* şi, respectiv *C*. Modelul *A* corespunde endopoligalacturonazelor speciei *Aspergillus niger* şi se caracterizează prin scindarea tetramerilor la trimeri şi acid galacturonic, şi prin scindarea extrem de lentă a trimerilor. Modelul *B* a fost evidenţiat în lumea vegetală, adică la tomate, şi se caracterizează prin scindarea rapidă a trimerilor şi prin scindarea alternativă a tetramerilor, fie la trimeri şi acid galacturonic, fie la două molecule de digalacturonat. Endopoligalacturonaza izolată de la specia *Erwinia carotovora* desemnează modelul *C* printr-o scindare specifică a pentamerilor şi a hexamerilor.

Activatatea endopoligalacturonazelor (endo PG) este testată prin urmărirea scăderii vâscozităţii unei soluţii de pectină 1% cu *p*H = 4,2, la temperatura de 30°C, folosindu-se un vâscozimetru de tip Ubelhode.

Prin determinări de vâscozitate la intervale scurte de timp se calculează timpul necesar scăderii vâscozităţii amestecului de reacţie la 50%. Se consideră 100% vâscozitatea amestecului de reacţie format din acid pectic sau pectinic şi 2 ml soluţie enzimă inactivată anterior prin fierbere timp de 10 minute.

O unitate de endopolimetilgalacturonază sau endopoligalacturonază este cantitatea de enzimă care reduce vâscozitatea soluţiei de substrat cu 50% în decursul a 10 minute de reacţie.

Endopoligalacturonazele au masele moleculare cuprinse între 30 şi 85 kDa, *p*I variază între 3,7 şi 8,3. *p*H-ul optim se află în domeniul acid, domeniul de variaţie fiind 3,8–5,5. În ceea ce priveşte variaţia valorilor K_M domeniul este restrâns între 0,14 şi 4,7 mg/l.

Endopoligalacturonazele pot fi inhibate de clorura de mercur, de acidul tanic, clorura de sodiu (în cazul bacteriilor marine), epicatechina, clorura de calciu şi de bariu ce precipită acidul poligalacturonic; o inhibiţie competitivă a fost semnalată în cazul pectinei la concentraţii de 1 mg/100 ml.

Exopoligalacturonazele. Exopoligalacturonazele hidrolizează poligalacturonaţii cu eliberarea acidului galacturonic. Acestea acţionează asupra extremităţilor nereducătoare ale substratului. Uneori, în urma atacului pot fi eliberate şi molecule de digalacturonat.

Activitatea exopoligalacturonazelor depinde de gradul de condensare al poligalacturonaţilor atacaţi, ce poate fi cuprins între 2 şi 7, ca şi de originea acestora.

Puţine exopoligalacturonaze au fost caracterizate fizico-chimic. Au fost izolate şi caracterizate exopoligalacturonaze de la speciile *Aspergilus niger* [Hara, 1984], *Aspergillus tubingensis* [Kester, 1996], *Bacillus* [Kobajashi, 2001] etc. Masele lor moleculare variază între 45 şi 70 kDa, având activitate optimă la *p*H acid de 3,5–5,5, *p*I fiind cuprins între 5,2 şi 5,6.

În concentrații cuprinse între 0,002 și 0,2 M, clorura mercurică activează exopoligalacturonaza; enzimele sunt inhibate de către ionii de calciu [Guevara, 1997] și competitiv de către acidul galacturonic și de acidul digalacturonic [Kester, 1996].

În urma atacului asupra extremităților acizilor pectici sau pectinici de către exopoligalacturonaza (exo-PG) se pun în libertate grupări aldehidice, astfel încât acțiunea acestor enzime se poate determina prin urmărirea creșterii puterii reducătoare a amestecului de reacție în anumite condiții stabilite de *p*H, temperatură, concentrație enzimatică și timp. Creșterea capacității reducătoare este determinată prin metoda Somogi–Nelson [Somogy, 1952]. Unitatea de exopolimetilgalacturonaza sau exopoligalacturonaza este considerată convențional a fi cantitatea de enzimă care produce un mol grupări aldehice, în timp de un minut, la 30°C și *p*H = 4,2.

16.5.3. Liazele

Endopectat liazele. Endopectat liazele hidrolizează poligalacturonații, îndepărtând din structura lor oligogalacturonații Δ 4:5 nesaturați. Aceste enzime au următoarele caracteristici: sunt sintetizate numai de microorganisme, acționează la *p*H-uri alcaline, necesită ioni de calciu pentru a fi active și scindează legăturile glicozidice prin transeliminare. Preferă substraturi precum poligalacturonații și pectinele slab metilate.

În funcție de substrat și de modul lor de atac endopectat liazele prezintă două mecanisme de acțiune. Modelul *A* prezintă ca substrat limită trigalacturonații nesaturați, iar în cazul modelului *B* acești trimeri nesaturați nu pot fi scindați.

Tardy, în 1997, prin compararea secvențelor de aminoacizi ale endopectat liazelor izolate de la *Erwinia chrysanthemi*, a evidențiat existența a două familii enzimatice. Enzimele din prima familie acționează numai asupra pectinelor slab metilate și au o afinitate de 10 ori mai mare pentru aceste substraturi decât enzimele aparținând celei de a doua familii, care acționează asupra pectinelor cu grad de metilare ce ajunge până la 45%.

Aceste enzime sunt caracterizate de *p*H-uri de acțiune alcaline, de valori relativ scăzute ale K_M; masele moleculare variază larg între 12 și 80 kDa, la un *p*I cuprins între 6,25 și 10,3.

Endopectat liazele sunt inhibate de prezența ionilor bivalenți de mercur, de EDTA, de epicatechină și de acidul salicilic [Tardy, 1997].

Determinarea activității endopectat liazei se efectuează prin urmărirea formării dublei legături între C-4 și C-5 din resturile de acid galacturonic. Conjugarea dublei legături cu gruparea carbonil de la C-6 face ca produșii să absoarbă în UV cu

un maxim de absorbție la 235 nm, astfel încât activitatea PTE se poate urmări prin determinarea creşterii densității optice la 235 nm.

Unitatea de activitate enzimatică (UE) este cantitatea de enzimă care conduce la o creştere a DO_{235} de 0,5 într-o cuvă de cuarț de un centimetru, timp de un minut, la 30°C şi *p*H = 5,2.

Exopectat liazele. Exopectat liazele scindează penultima legătură glicozidică din structura poli-D-galacturonaților pornind de la extremitatea reducătoare cu eliberare de molecule de acid digalacturonic nesaturate.

Un număr redus de microorganisme prezintă acest tip de enzime, printre care amintim: *Clostridium multifermentes*, *Erwinia aroideae*, *Fusarium culmorum*, *Streptomyces nitrosporeus*.

Sunt caracterizate de un *p*H optim de 8,0 – 9,0 şi ionii de calciu sunt indispensabili activității exopectat liazelor.

Pectin liazele. Pectin liazele degradează substraturi cu grad înalt de esterificare, produşii finali fiind oligo-D-galacturonați nesaturați. Activitatea lor este legată de distribuția grupărilor esterificate în catena poligalacturonică. Astfel, pectin liazele au o activitate mai ridicată asupra substraturilor deesterificate enzimatic, față de substraturile deesterificate în mediu alcalin. Pectații, amidele acidului pectic şi glicilesterii pectinei nu sunt degradați de pectin liaze.

Până în prezent au fost izolate şi caracterizate numai pectin liaze de origine fungică. Acestea au un *p*H optim în domeniul acid şi valori reduse ale K_M. Nu necesită pentru activitatea lor ioni de calciu, cu mici excepții (*Fusarium oxysporum*), dar pot avea rol activator alături de alți ioni, precum ionii de cupru, magneziu, mangan şi mercur (2 mM). Activitatea pectin liazei poate fi inhibată de acidul p-cloromercuri-fenil-sulfonic, anhidridă maleică, N-etilmaleimida.

16.6. DOMENII DE UTILIZARE ALE ENZIMELOR PECTINOLITICE

Enzimele pectinolitice şi fiziologia plantelor. Enzimele pectinolitice sunt implicate direct în fiziologia şi patologia plantelor. Sub acțiunea enzimelor pectinolitice, protopectina din plante, insolubilă în apă, devine pectină solubilă ce va fi degradată mai departe pe durata maturării sau a infectării plantelor. Pe parcursul maturării fructelor există o strânsă legătură între activitățile pectinesterazelor şi endopoligalacturonazelor şi formarea pectinelor solubile în apă. De exemplu, în fructele tomatelor transgenice, la care s-a expresat ARN antisens

pentru poligalacturonază, activitatea enzimatică a acesteia a fost foarte mică, de până la 1% din cea a fructelor normale [Langlez ş.a., 1994].

Interacţiunea dintre microorganisme şi plantele superioare este una foarte complexă, în care enzimele pectinolitice joacă roluri extrem de importante, prezenţa lor conducând la macerarea şi distrugerea celulelor [Salina ş.a., 1995, Frederici ş.a., 2001], la apariţia reacţiilor de apărare ale plantei contra agentului patogen, la creşterea concentraţiei de etilenă ce va determina ulterior căderea fructelor [Agravante ş.a., 1991].

Inducerea patogenităţii este strâns legată de afinitatea patogenului la peretele celular polizaharidic al gazdei. Astfel, orice patogen va produce enzime pectinolitice, producţia acestora fiind în corelaţie directă cu virulenţa şi, în final, enzimele pectinolitice produse de agentul patogen se vor regăsi în ţesuturile plantei infectate. În acelaşi timp, în relaţia patogen–plantă gazdă nu este suficientă producerea enzimelor pectinolitice, un rol important având susceptibilitatea sau rezistenţa plantei la atacul patogenului. Plantele deţin un arsenal complex de autoapărare, inhibând enzimele pectinolitice. Mecanismele de protecţie se realizează pe căi fizico-chimice diverse, şi anume:

– prezenţa unor substanţe în ţesutul plantelor cum ar fi acidul cafeic, antocianidinele, epichatechina, compuşii fenolici, acidul salicilic, zaharoza etc.;

– formarea de hormoni sau de analogi ai acestora;

– transformarea acidului pectic în pectat de calciu rezistent la acţiunea enzimelor pectinolitice;

– sinteza de inhibitori proteici naturali ce vor forma complecşi cu enzimele pectinolitice, inactivându-le.

Fructe precum merele şi zmeura produc proteine care inhibă poligalacturonazele agentului patogen *Botrytis cinerea* [Zao ş.a., 1995, Johnston ş.a., 1993]. De asemenea, leguminoase precum soia şi fasolea pot produce proteine care interacţionează cu fungii patogeni din genurile *Sclerotinia*, *Aspergillus* şi *Fusarium*.

Studii ample au fost efectuate asupra unuia dintre cei mai răspândiţi agenţi patogeni, *Botrytis cinerea*, ce cauzează mari pagube atât în câmp, cât şi în depozit. Aceste daune se datorează activităţii endopoligalacturonazei acestui fung filamentos care degradează peretele celular. Prin mutaţii ţintă, s-a demonstrat că cel puţin două endopoligalacturonaze sunt implicate în infecţia plantei gazdă. Deleţia genei Bcpg1 a condus la reducerea capacităţii de infectare la tomate şi la mere, în timp ce deleţia genei Bcpg2 a redus posibilitatea de infectare la soia şi mai puţin la tomate. Aceste rezultate vor putea fi de folos în identificarea şi izolarea unor noi proteine de origine vegetală care pot inhiba poligalacturonaza de origine fungică [Krooshof ş.a., 2002].

Aplicaţiile enzimelor pectinolitice. Primele informaţii privind existenţa enzimelor pectinolitice datează din mijlocul secolului trecut. Cercetările ulterioare au dus la evidenţierea importanţei practice a acestor enzime în diferite sectoare industriale, în special în industria alimentară (sucuri, vin, ceai, cafea, cacao), dar şi în industria textilă.

Deşi obţinerea industrială a enzimelor pectinolitice este printre primele tehnologii dezvoltate de obţinere a acestora, în prezent, pe plan mondial, se obţin mult mai puţine preparate enzimatice pectinolitice în comparaţie cu alte enzime. Astfel, se apreciază că producţia de preparate enzimatice pectinolitice este de circa 30 tone anual pe plan mondial, în timp ce producţia de proteaze, de exemplu, este de circa 300 tone, iar a uneia din cele mai noi introduse enzime în producţia industrială, glucozizomeraza, este de 800 tone.

Utilizarea enzimelor pectinolitice obţinute industrial cu ajutorul microorganismelor a fost introdusă în prelucrarea fructelor sub formă de sucuri în 1930, de către Kertesy, în S.U.A., şi de către Mehlitz, în Germania.

Enzimele pectinolitice sunt absolut indispensabile în industria sucurilor din fructe şi legume, fiind utilizate în procesul tehnologic pe parcursul etapelor de extracţie, limpezire şi depectinizare. Autoclarificarea sucului sub acţiunea enzimelor pectinolitice din fructe este mare consumatoare de timp, de aceea se face apel la preparate enzimatice comerciale de origine microbiană. Clarificarea sucurilor necesită acţiunea sinergică a mai multor tipuri de enzime pectinolitice. Astfel, sucurile de mere au fost clarificate rapid prin combinarea activităţii endopoligalacturonazice (din *Aspergillus niger*) şi pectinesterazice (din *Aspergillus oryzae*). Exopoligalacturonazele folosite în amestec nu au fost eficiente datorită adsorbţiei lor în proporţie destul de mare pe protopectina din mere [Hara ş.a., 1986]. Sucurile de grapefruit prezintă polimeri pectici mult mai rezistenţi şi pentru clarificarea lor se folosesc pectin liaze izolate de la specia *Aspergillus sojae* [Ishii ş.a., 1973]. Tehnologia obţinerii sucurilor de citrice cu un *p*H foarte acid face apel la acţiunea combinată a pectinesterazei proprii fructelor şi a poligalacturonazei izolate de la specia *Cortcium rolfesii*. Avantajul utilizării acestei poligalacturonaze este că domeniul ei de *p*H este cel acid (2,5), condiţii considerate aseptice [Tagawa ş.a., 1988].

Sub acţiunea combinată a enzimelor pectinolitice, a celulazelor şi a hemicelulazelor fructele pot fi lichefiate [Grassin ş.a., 1996]. De asemenea, unele fructe şi legume au fost macerate cu ajutorul enzimelor pectinolitice în vederea obţinerii alimentelor pentru sugari [Recourt ş.a., 1996]. Pectinesteraza izolată de la *Penicillium feulatum* a fost utilizată în producerea de pectine cu grad scăzut de metilare, utilizate în medicină şi la obţinerea alimentelor pentru diabetici.

Pectinesteraza fiind foarte des utilizată în industria alimentară, cunoscut fiind faptul că în urma acţiunii acesteia se produce metanol, au fost efectuate teste toxicologice pe animale. Astfel, administrarea orală, timp de 13 zile, a unei cantităţi de 10 g preparat proteic cu activitate pectinesterazică/ kg corp nu a afectat greutatea, semnele vitale, comportamentul sau parametrii biochimici ai şobolanilor [Lissau ş.a., 1998].

Enzimele pectinolitice mai pot fi utilizate la tratarea boabelor de cafea, evitându-se fermentarea nedorită a boabelor. Sunt eficiente şi în procesul de obţinere a cafelei tip instant în procesul de prelucrare a boabelor de cafea.

Enzimele pectinolitice au fost introduse în vinificaţie încă din 1947 şi, de atunci, au fost utilizate pentru a mări rata de extracţie a mustului (8–14 %), pentru a mări rata filtrării şi pentru a optimiza extracţia culorii şi a aromelor [Cruess ş.a., 1955; Brown şi Ough 1981; Haight şi Gump, 1994; Lao ş.a., 1997; Ducruet ş.a., 1997]. Majoritatea enzimelor comerciale provin de la specia *Aspergillus niger.* Preparatele enzimatice de origine fungică alături de enzimele pectinolitice conţin şi alte enzime, cum ar fi celulazele şi hemicelulazele (enzime de macerare), care degradează peretele celular contribuind la extracţia culorii în cazul strugurilor roşii. De asemenea, conţin şi β-glucozidaze ce măresc conţinutul în terpene în must şi vin, înnobilând buchetul şi aroma. În vinificaţie doza uzuală de enzime pectinolitice este de 3–5 g/litru de must sau vin [Benatier ş.a., 1999]. Metodele moderne analitice au arătat însă şi partea „negativă" a acestor preparate comerciale. Aceste preparate sunt adesea contaminate cu alte enzime, considerate impurităţi. Una dintre acestea este β-glicozidaza, care poate degrada antocianii, conducând la un vin mai puţin colorat. Pectinmetil esterazele eliberează în vin metanol peste limita admisă, fiind toxic pentru om [Lao, 1996].

Pectinele, făcând parte împreună cu celuloza din categoria polizaharidelor neamidonoase, au un efect negativ în alimentaţia animalelor monogastrice (mai ales a păsărilor) datorită digestibilităţii scăzute a acestora. Acest efect negativ poate fi înlăturat prin încorporarea de enzime pectinolitice în furaje. Aceste enzime se aplică, de obicei, în hrana tineretului aviar şi a broilerilor sub forma unor preparate enzimatice complexe care mai conţin şi alte tipuri de enzime, având ca efect reducerea vâscozităţii din intestine prin distrugerea unor factori antinutriţionali, ca betaglucani şi pentozani, şi obţinerea unui surplus de energie din polizaharidele slab utilizate sau total neutilizate, ca pectinele şi celuloza. Un astfel de preparat enzimatic este Kemzyme, produs de Kemin Europa.

O altă utilizare a enzimelor pectinolitice este cea din domeniul textil, la înmuierea fibrelor vegetale. Fibrele au un conţinut ridicat (25–30 %) de hemiceluloză şi pectine alături de polimerul natural abundent, celuloza. Prezenţa lor

îngreunează procesul de înmuiere şi prelucrare. Prin fierberea acestor fibre în amestecuri alcaline, pectinele şi hemiceluloza se vor separa de celuloză, dar fibra va pierde din rezistenţă, iar muncitorii pot avea sănătatea afectată. Astfel, se preferă utilizarea hemicelulazelor şi pectinazelor de la specia *Aspergillus* pentru degradarea substratului în condiţii mai blânde, ce nu vor degrada calitatea fibrelor textile.

În prelucrarea biomasei vegetale au fost utilizate amestecuri de enzime pectinolitice de origine microbiană, realizându-se curăţarea mediului şi reciclarea resurselor naturale. Deşeurile rezultate în urma prelucrării citricelor sunt bogate în glucide, fapt care permite utilizarea lor pentru producerea furajelor. Tratarea acestor deşeuri cu pectinesteraze microbiene are ca rezultat formarea pectatului de calciu concomitent cu coagularea deşeului. Astfel, apa va fi mai uşor îndepărtată, conducând în final la reducerea combustibilului utilizat în procesele de uscare.

Datorită conţinutului ridicat de glucide, proteine şi pectine, deşeurile de citrice, mai cu seamă coaja, sunt utilizate în producerea de endopoligalacturonază pe scară industrială, în prezenţa fungului filamentos *Aspergillus niger*. Activitatea enzimatică maximă a fost obţinută pe un substrat semisolid (15%), după o incubare timp de 120 de ore la 30°C [Dhillon ş.a., 2004].

Domeniile mai noi de utilizare a enzimelor pectinolitice sunt legate de cercetare. Astfel, obţinerea de protoplaşti foloseşte alături de celulaze şi hemicelulaze, enzime pectinolitice. De asemenea, ele pot fi utilizate la dozarea concentraţiilor de pectină prin metoda enzimatică. Tehnica detectează scăderea absorbţiei la 340 nm, scădere datorată oxidării NADPH pe parcursul transformării acidului D-galacturonic în lactonă sub acţiunea glucuronolacton oxidazei. Printr-o tehnică asemănătoare se poate determina şi concentraţia pectinelor din fructe şi legume [Yoskioka, 1992].

Date fiind aspectele negative – inclusiv preţurile ridicate – arătate mai sus ale preparatelor fungice, cercetările din ultima vreme s-au axat pe pectinaze native obţinute de la specii de drojdii din genul *Saccharomyces*. Foarte puţine specii s-au dovedit a fi bune producătoare de enzime pectinolitice. Ingineria genetică vine în ajutorul acestui neajuns tehnologic prin clonarea genelor ce codifică enzimele pectinolitice de la fungi la drojdii, şi utilizarea acestor drojdii mutante în procesele fermentative.

Pe plan mondial există preocupări de relansare a exploatării enzimelor pectinolitice specifice, de origine microbiană în procesele agro-industriale. Cercetările se îndreaptă spre studii combinate asupra enzimelor şi asupra substraturilor la nivel molecular. Principalele obiective ale cercetătorilor sunt legate de:

a) obținerea de tulpini de fungi și bacterii înalt producătoare de enzime pectinolitice prin manipulare genetică și printr-un management corect al fiziologiei microbiene;

b) caracterizări ale specificității enzimelor pectinolitice prin analize cinetice (*p*H, profil T, substrat oligo- sau polimeric, mod de acțiune, inhibitori);

c) analiza structurii ultrafine a diferitelor pectine în relația cu specificitatea enzimelor pectinolitice;

d) studiul degradării pectinelor *in situ.*

Rezultatele studiilor vor putea fi ulterior direcționate spre industrie în următoarele scopuri:

a) obținerea de noi produse (pectine, oligozaharide) care respectă normele de protecție a mediului;

b) ameliorarea extracției de protopectină;

c) îmbunătățirea procesării fructelor și legumelor (extracția, limpezirea, lichefierea și macerarea);

d) creșterea factorului nutrițional în nutrețurile animalelor;

e) sinteza unor pectinaze inhibitoare specifice ca potențial agent de protecție a plantelor.

Cel mai utilizat microorganism pentru producerea de enzime pectinolitice este mucegaiul saprofit *Aspergillus niger.* Aceste enzime se încadrează în statutul GRAS (*Generally Regarded As Safe*) legat de siguranța alimentară a utilizării lor. De altfel, ele reprezintă 45% din piața mondială a enzimelor. Pe baza ultimelor secvențe genomice decodate, se estimează că doar o mică parte din potențialul enzimatic al speciei *A. niger* este caracterizat. În prezent se efectuează studii asupra expresării genelor codante ale pectinazelor și posibilitatea supraexpresării acestor gene. Până în prezent au fost identificate 38 de gene ce codifică pectinaze. Prin tehnica ADN *microarray*, profilul transcripțional la *A. niger* a fost completat [Benen, 2003].

De asemenea, majoritatea genelor codante ale enzimelor pectinolitice au fost clonate pornind de la specia fungului filametos *Aspergillus niger.* Dar, cu toată multitudinea de pectinaze pe care o produce această specie, amestecul enzimatic nu poate degrada complet toate pectinele. Un caz particular este cel al pectinelor din soia care conțin xilogalacturonan în locul homogalacturonanului. Cercetări preliminare au arătat că specia *Rhizopus*, care se dezvoltă ideal pe soia, poate fi o sursă de noi activități pectinolitice, mai cu seamă de xilogalacturonază și ramnogalacturonază. În aceeași situație se află și alți fungi ce se dezvoltă natural pe fructe, cum ar fi cei din genurile *Penicillium*, *Byssochlamys* și *Paecilomyces*, ale căror

gene codante vor fi clonate şi supraexpresate, enzimele obţinute urmând a fi caracterizate în detaliu.

Recent, gena codantă *PGU1* a poligalacturonazei de origine levuriană a fost clonată de la specia *Saccharomyces cerevisiae* la specia *Schizosaccharomyces pombe*, în vederea utilizării ei în industria agroalimentară [Sieiro ş.a., 2003]. Endopoligalacturonaza recombinantă s-a dovedit a fi foarte eficientă în reducerea viscozităţii soluţiilor de acid poligalactornic şi mult mai stabilă la *p*H şi temperatură diferite în comparaţie cu enzima nativă.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

17. ENZIME LIPOLITICE

Lipazele sunt enzime ce fac parte din clasa hidrolazelor, având un rol important în metabolismul grăsimilor. Ele hidrolizează grăsimi şi uleiuri cu formare de acizi graşi liberi, diferite gliceride şi glicerină.

Trebuie arătat însă că există destule confuzii cu privire la semnificaţia exactă a termenilor de lipază şi esterază, întrucât ambele hidrolizează legăturile esterice ale acizilor carboxilici. Unii cercetători consideră că deosebirea esenţială dintre lipaze şi esteraze constă în starea fizică a substratului asupra căruia acţionează. Astfel, esterazele pot hidroliza substraturi solubile sau dispersate total, iar lipazele nu. De aceea s-a propus de către Wills şi Jensen să se definească lipazele drept enzime care hidrolizează esterii la o interfaţă de tip ulei-apă, într-un mediu eterogen.

După originea lor, lipazele se pot clasifica în:

- lipaze de origine microbiană;
- lipaze din plante;
- lipaze din lapte;
- lipaze pancreatice;
- lipoprotein lipaze;
- lipaze hormon – senzitive.

17.1. OBŢINEREA LIPAZELOR DIN CULTURI MICROBIENE

17.1.1. Microorganisme producătoare de lipaze

Lipazele microbiene sunt produse de o serie de specii de bacterii, ciuperci (fungi) şi drojdii. Cele mai importante microorganisme producătoare de lipază, împreună cu activităţile lipazice maxime obţinute în mediile de cultură şi în condiţiile de determinare a activităţii, sunt prezentate în tabelul 17.1.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 17.1

Surse de lipaze microbiene

Specia microbiană	Tipul de fermentație	Activitatea [EU[a)]/ml]	Condiții de determinare a activității [c)]
1	2	3	4
Bacterii			
Staphylococcus aureus	Flacoane agitate	4,5	37°C, *p*H=8,0
Pseudomonas nitroreducens	Fermentator 2 l	500,0	37°C, *p*H=9,0
Pseudomonas fragi	Fermentator 20 l	75,0	37°C, *p*H=9,0
Alcaligenes species	Fermentator 15 l	800,0	37°C, *p*H=8,7
Bacillus licheniformis	Flacoane agitate	6,0	45°C, *p*H=8,5
Drojdii			
Candida cylindracea	Flacoane agitate	[b)]	30°C, *p*H=7,0
Saccharomycopsis lipolytica	Flacoane agitate	40,0	30°C, *p*H=9,5
Candida lipolytica	Fermentator 2l	1,0	37°C, *p*H=8,2
Fungi			
Aspergillus luchuensis	Mediu solid	–	40°C, *p*H=7,0
Aspergillus niger	Flacoane agitate	4,0	37°C, *p*H=6,5
Rhizopus delemar	Submers	60,0	30°C, *p*H=5,6
Rhizopus arrhizus	Fermentator 100 l	35,0	37°C, *p*H=7,5
Rhizopus delemar	Fermentator tip turn și fermentator 3 l	460,0	30°C, *p*H=8,5
Geothricum candidum	Cultură lichidă statică	6,0	32°C, *p*H=8,5
Geothricum candidum	Flacoane agitate	170,0	30°C, *p*H=5,6
Mucor lipolyticus	Flacoane agitate	90,0	37°C, *p*H=8,0
Humicola lanuginosa	Fermentator 600 l	55,0	45°C, *p*H=8,0
Phycomyces species	Fermentator	160,0	37°C, *p*H=7,0
Penicillium funiculosum	Flacoane agitate	[b)]	37°C, *p*H=8,0

[a)] 1EU = cantitatea de enzimă care determină eliberarea unui μmol acid gras/min în condiții standard.

[b)] Activitatea enzimatică este exprimată în alte unități, care cu datele existente nu au putut fi convertite în EU.

[c)] Drept substrat pentru determinarea activității s-a utilizat în toate cazurile uleiul de măsline.

În mod uzual, lipazele microbiene sunt enzime extracelulare. Lipazele extracelulare pot fi obținute din culturi tinere, de preferință în timpul fazei de creștere logaritmică, fiind în această perioadă mai puțin afectate de liza celulelor. Unii cercetători au raportat existența și a unor lipaze intracelulare, cum ar fi cele produse de bacteriile din specia *E. coli, Streptococcus thermophilus* și *Strepto-*

coccus lactis, drojdii – *Saccharomycopsis lipolytica*, sau fungi – *Rhizopus chinensis*.

Lipazele de origine fungică au fost obținute atât din culturi pe medii solide cât și din culturi submerse. Dintre fungii filamentoși cultivați pe medii solide, rezultate bune s-au obținut cu *Mucor miehei, Penicillium camemberti* și *Penicillium candidum*.

În general, însă, numărul referințelor privitoare la obținerea de lipaze din culturi pe medii solide este scăzut.

17.1.2. Obținerea lipazelor în culturi submerse

Majoritatea cercetărilor au stabilit că lipazele se pot obține cel mai avantajos din culturi submerse aerate.

Factorii care influențează biosinteza lipazelor în culturi submerse sunt prezentați în cele ce urmează.

Influența compoziției mediului de cultură. Tipul și concentrația componentelor mediului de cultură pentru biosinteza lipazei diferă foarte mult de la o tulpină la alta și sunt propice unor optimizări ulterioare. Aceste medii conțin, în general, drept sursă de carbon un glucid simplu sau complex, însă unele drojdii producătoare de lipază pot fi cultivate, de asemenea, pe uleiuri sau hidrocarburi. Producția de lipază în general nu depinde decât în mică măsură de natura glucidului utilizat.

O altă problemă importantă este natura sursei de azot și realizarea unui raport optim azot/carbon în mediul de cultură. O serie de surse au semnalat că lipaza se obține cel mai bine dacă microorganismul este crescut pe un mediu conținând peptonă. Anumite tipuri de peptone sunt mai puțin potrivite ca și constituenți ai mediului de cultură decât altele, cu toate că dezvoltarea microorganismului nu este afectată. Conform datelor din literatura de specialitate, randamentul lipazei obținute a crescut considerabil dacă mediul a avut în compoziție hidrolizat de cazeină, triptonă, polipeptonă sau făină de soia.

În cazul biosintezei lipazei din *Pseudomonas species*, cea mai potrivită sursă de azot s-a dovedit a fi ureea. Dacă pentru obținerea lipazei se folosește *Candida lipolytica*, rezultatele cercetărilor indică drept sursă de azot sulfatul de amoniu și ureea.

Un mare număr de cercetători au studiat obținerea lipazelor pe medii sintetice. Astfel, un studiu comparativ efectuat pe 41 de medii dehidratate diferite a dus la formularea unui mediu sintetic pentru biosinteza lipazei din *Pseudomonas fungi* prin înlocuirea peptonei cu un amestec de arginină, lizină, acid aspartic și acid glutamic. S-au obținut randamente în lipază de aproape 90% față de cele obținute pe mediu cu peptonă.

Prezența lipidelor în mediul de cultură poate induce, iar în alte cazuri poate inhiba, producerea lipazei. Chander și alții au constatat că adăugarea de lipide în mediul de cultură pentru biosinteza lipazelor de către *Penicillium chrysogenum, Fusarium solani* și *Geothricum candidum* inhibă creșterea microorganismelor și determină scăderea producției de lipază. În ceea ce privește lipaza din *Mucor mucedo*, s-a constatat că introducerea de lipide în mediul de cultură are un efect diferențiat. Astfel, dintre trigliceridele testate (în concentrație de 0,1% raportat la mediul de bază), tributirina a determinat creșterea producției de lipază cu 66%, în timp ce trigliceridele conținând acizi grași nesaturați cu catenă lungă (ulei de măsline, ulei de floarea-soarelui, ulei de muștar etc.), au avut acțiune ușor inhibitoare. Efectul inhibitor cel mai puternic l-a avut trioleina, care a cauzat o reducere cu 58% a producției de lipază. Creșterea randamentului în lipază în prezența tributirinei a fost menționată în cazul lui *Penicillium roqueforti*, în timp ce prezența uleiului de porumb și a celui de măsline determină inhibarea acestuia cu 21, respectiv 29%.

Una din sursele cele mai importante de lipază pentru biotehnologii este *Aspergillus niger*. Un studiu cuprinzător referitor la biosinteza lipazei din culturi submerse de *A. niger* a stabilit compoziția optimă a mediului de cultură, plecând de la un mediu de bază constituit din: 0,1% NH_4NO_3; 0,2% KH_2PO_4; 0,04% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 1% zaharoză și 1% ulei de măsline [Ioniță și colab., 1998].

Efectul diferitelor surse de carbon asupra randamentului în lipază și al creșterii miceliului ciupercii este prezentat în tabelul 17.2. S-a determinat că sursa optimă de carbon este zaharoza. Glucoza, maltoza și fructoza determină o creștere bună a miceliului, dar randamentul în lipază este mai scăzut. Concentrația optimă de zaharoză din mediul de cultură s-a determinat a fi de 1%.

Tabelul 17.2

Efectul sursei de carbon asupra randamentului în lipază și al creșterii miceliului de *A. niger* în cultură submersă

Sursa de carbon [1%]	Activitatea lipazică [unități/5ml mediu de cultură după 96 ore]	Greutatea miceliului uscat [g/l, după 96 ore]
Glucoză	9,2	13,0
Maltoză	7,6	11,5
Fructoză	8,2	11,0
Amidon solubil	1,6	10,0
Lactoză	7,8	8,6
Zaharoză	22,2	13,4
Xiloză	Urme	4,0
Rafinoză	Urme	2,0
Citrat de Na	Urme	2,5
Acetat de Na	Urme	1,8

În tabelul 17.3 sunt prezentate rezultatele încercărilor cu diverse surse de azot de natură organică sau anorganică. Se poate observa că sursa de azot cea mai bună este azotatul de amoniu, concentrația sa optimă în mediul de cultură fiind 0,1%.

Tabelul 17.3

Efectul sursei de azot asupra randamentului în lipază și al creșterii micheliului de *A.niger* în culturi submerse

Sursa de azot [0,1%]	Activitatea lipazică [unități/5ml mediu de cultură după 96 ore]	Greutatea micheliului uscat [g/l, după 96 ore]
$(NH_4)_2SO_4$	4,0	12,6
NH_4Cl	6,0	11,5
NH_4NO_3	22,0	13,0
$NaNO_3$	10,2	13,0
Uree	4,0	12,0
Peptonă	3,0	12,0
Triptonă	3,2	6,0
Acid aspartic	4,3	6,0
Acid glutamic	5,1	6,6

În aceeași cultură a fost determinată și influența sărurilor minerale (tabelul 17.4). În cazul acestei tulpini prezența ionilor de Fe^{2+} și Mg^{2+} favorizează producerea lipazei. Concentrațiile optime determinate au fost 0,1% pentru $FeSO_4$ și 0,04% pentru $MgSO_4$. Ionii de K^+, Na^+, Ca^{2+} nu influențează randamentul în enzimă.

Tabelul 17.4

Efectul sărurilor minerale asupra randamentului în lipază și al creșterii micheliului de *A. niger* în culturi submerse

Sarea minerală	Activitatea lipazică [unități/5ml mediu de cultură după 96 ore]	Greutatea micheliului uscat [g/l, după 96 ore]
KCl	2,9	3,5
NaCl	3,1	4,0
K_2SO_4	3,2	4,2
Na_2SO_4	3,0	4,5
$CaCl_2$	3,5	3,9
$MgSO_4$	5,6	10,5
$MgCl_2$	4,5	8,2
$FeSO_4$	7,2	6,5
Mediu de control *	3,0	3,8

* Conținând zaharoză, ulei de măsline, $(NH_4)_2PO_4$ și acetat de amoniu.

Necesitatea utilizării unei surse de fosfat în mediul de cultură nu este menționată decât rareori în literatura de specialitate, fiind indicat fosfatul de amoniu monoacid. În cazul acestei tulpini de *A. niger*, însă, prezența KH_2PO_4 în concentrație de 0,2% duce la obținerea de randamente mai bune decât cele obținute cu $(NH_4)_2HPO_4$.

Influența aerării. Cercetările au evidențiat creșterea producerii de lipază în cazul culturilor aerate pentru majoritatea microorganismelor producătoare de lipază, însă gradul de aerare necesar pare să difere de la o specie la alta. S-a constatat accelerarea dezvoltării celulelor și a producerii de lipază în culturi agitate de *Penicillium species, Rhizopus species* și *Geothricum species*. În cazul lipazei din *Mucor mucedo*, activitatea lipazei pentru culturi în flacoane agitate a fost mai mare cu 40% decât în cazul flacoanelor neagitate. Efectul aerării nu este însă întotdeauna pozitiv asupra producției de lipază. S-a constatat, de exemplu, că în cazul culturilor de *Pseudomonas fragi* aerarea intensă determină reducerea activității lipazice. În cazul microorganismelor *Candida lipolytica, Pseudomonas fragi* și *Pseudomonas fluorescens* s-a observat că utilizând culturi agitate se obține o creștere mai pronunțată a celulelor și în faza inițială o creștere a producției de lipază, urmată însă de o scădere rapidă a activității lipazice în cazul continuării agitării.

Influența fazei de dezvoltare a celulelor. Un alt factor important este relația dintre creșterea celulei și formarea lipazei în timpul cultivării microorganismelor. Majoritatea cercetărilor au demonstrat că cea mai mare cantitate de lipază se produce în timpul fazei logaritmice de creștere, de exemplu în cazul microorganismelor *Acinetobacter species, Rhizopus arrhivus, Pseudomonas fragi* și *Pseudomonas aeruginosa.*

Unii cercetători au arătat însă că în anumite cazuri eliberarea lipazei în mediul de cultură începe la sfârșitul fazei logaritmice de creștere și acumularea enzimei are loc în timpul fazei staționare. Astfel este cazul culturilor de *Pseudomonas fluorescens*, la care activitate lipazică în mediu s-a detectat doar după 4–5 zile de incubare.

17.1.3. Purificarea și caracterizarea lipazelor microbiene

Majoritatea enzimelor obținute prin izolare din țesuturi vegetale sau animale sau din culturi microbiene trebuie purificate până la eliminarea enzimelor care pot cataliza reacții secundare nedorite.

În cazul enzimelor extracelulare, cum sunt majoritatea lipazelor microbiene, care sunt secretate în mediul de cultură după terminarea fermentației, microorganismele se separă de mediu prin centrifugare sau filtrare. Soluția

rezultată poate fi uneori concentrată pentru a nu se manipula volume prea mari. Pentru aceasta se pot folosi membrane de ultrafiltrare.

Următoarea etapă este separarea diferitelor proteine prin precipitare fracționată. Se știe că distribuția resturilor hidrofobe și hidrofile la suprafața moleculei de proteină influențează puternic solubilitatea ei în diferiți solvenți. Capacitatea de solvatare a diferitelor proteine de către apă poate fi modificată în sensul reducerii solubilității prin schimbări de *p*H, tărie ionică, adăugare de solvenți organici miscibili cu apa, de alte substanțe dizolvate sau prin combinarea acestor metode, împreună cu modificarea temperaturii.

Principalele tehnici utilizate în cazul lipazelor sunt:

- precipitarea selectivă cu ajutorul sărurilor neutre;
- precipitarea fracționată, cu ajutorul solvenților organici miscibili cu apa, cum ar fi etanolul sau acetona;
- gel-filtrarea;
- cromatografia de interacțiune hidrofobă;
- cromatografia de afinitate.

O problemă foarte importantă care apare în cursul purificării enzimelor este pierderea de activitate datorită diferiților factori: denaturarea proteinei enzimatice, concentrația prea scăzută a proteinei, inactivarea centrului catalitic activ (reversibilă sau ireversibilă), degradarea enzimei produsă de protezele din mediu. Pentru stabilizarea soluțiilor enzimatice, în afară de sulfatul de amoniu pot fi utilizați și alți compuși cum ar fi glicerina care are și avantajul că permite conservarea la temperaturi sub 0°C, fără a congela enzima.

O investigare calitativă a enzimelor prezente într-un preparat tehnic comercial de lipază din *Aspergillus niger*, conținând 55% proteină, a evidențiat prezența și a următoarelor enzime: esterază, protează, amilază, endo-1,4-β-glucanază, xilanază, pectinmetilesterază, poligalacturonază, catalază, β-D-glucozidază și β-D-galactozidază. Pentru purificare, soluția enzimei brute rezultate după ultrafiltrare s-a supus cromatografiei de schimb ionic pe DEAE-Trisacril M. Fracțiunile cu activitate lipazică s-au concentrat prin ultrafiltrare și s-au purificat în continuare prin gel-filtrare pe *Sephadex 650*. S-au obținut două izoenzime notate lipază I și lipază II, constatându-se dispariția activității glucozidazice și galactozidazice. Eliminarea impurităților rămase s-a făcut prin cromatografie hidrofobă pe *Phenylsepharose CL-4B* și recromatografiere pe același gel în condiții diferite. După această purificare s-a constatat, prin focusare izoelectrică, obținerea unor lipaze omogene. Lipazele I și II au puncte izoelectrice diferite, la 4,0 și respectiv 3,5. Masele moleculare determinate prin gel-filtrare au fost de 31 000 și respectiv 19 000 daltoni, iar *p*H-ul optim s-a situat pentru ambele între 5 și 6, rămânând însă active și la *p*H = 7–8.

17.2. APLICAȚII ALE LIPAZELOR MICROBIENE

Obiectivul major în industria de uleiuri şi grăsimi este producerea unor tipuri de trigliceride cu proprietăți de topire dorite. În acest sens se utilizează interesterificarea catalizată de lipaze a trigliceridelor disponibile. Acest potențial tehnologic al lipazelor a fost preconizat de Macrae şi echipa de cercetare Unilever ca o posibilitate a aplicării lipazelor în medii apoase în scopuri industriale.

Una din realizările cruciale ale colectivului de la Unilever a fost obținerea unor preparate imobilizate de lipaze cu specificitățile dorite. Un astfel de produs, *Lipozyme*, este disponibil azi în cantități industriale, iar în prezent se fac cercetări pentru realizarea unor noi preparate de lipaze imobilizate. Multe cercetări recente se ocupă cu diferite aspecte ale îmbunătățirii biocatalizatorilor pentru procesele Unilever, inclusiv noi tipuri de suporturi, lipaze modificate chimic solubile în solvenți organici şi lipaze fixate pe polimeri hidrofobi.

Procesul de interesterificare catalizat de lipaze se preconizează a fi de largă utilitate în industria farmaceutică şi alimentară.

Aplicarea lipazelor ca aditivi pentru detergenți pentru facilitarea scoaterii grăsimilor din țesături în timpul procesului de spălare este astăzi cea mai importantă aplicare a lipazelor. Pentru a fi fezabile, prețul lipazelor pentru detergenți trebuie să fie la nivelul altor enzime destinate industriei de detergenți. Mai mult, o lipază utilizabilă în producția de detergenți trebuie să fie stabilă şi activă în prezența proteazelor, cel puțin în timpul perioadei de spălare. Cu toate acestea, în 1988 s-a scos pe piață lipaza pentru detergenți *Lipolase*. Acest produs este obținut în mod curent utilizând o tulpină de *Aspergillus oryzae* în genomul căreia a fost inserată o genă pentru lipază.

BCU IAŞI / CENTRU VECHI

18. GLUCOZOXIDAZA

18.1. GENERALITĂŢI. OXIDAREA ENZIMATICĂ A GLUCOZEI

Glucozoxidaza se cunoaşte încă din anul 1904, când s-a demonstrat posibilitatea oxidării glucozei cu un extract de *Aspergillus niger*.

Datorită importanţei sale comerciale mai mici, această enzimă a fost mai puţin studiată, neatrăgând atenţia ca alte enzime, cum ar fi glucozizomeraza de exemplu. Abia în 1975, Scott întocmeşte o lucrare de sinteză în legătură cu proprietăţile de bază ale enzimei. Glucozoxidaza este produsă de diferite microorganisme, în special de fungi, la care proprietăţile enzimei variază în funcţie de specia producătoare.

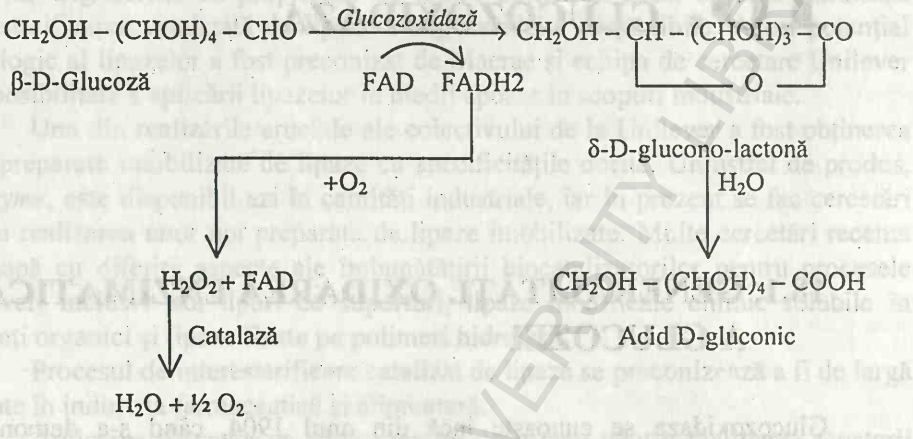
Glucozoxidaza, numită şi β-D-gluco-piranoz-dehidrogenază sau β-D-glucozo-oxigen-1-oxidoreductază (E.C. 1.1.3.4) este o flavoproteină care conţine 1 mol proteină, 2 moli flavinadenin-dinucleotidă (FAD) şi are o greutate moleculară de 152 000–192 000 Da, în funcţie de sursa din care a fost izolată. Această enzimă are o stabilitate maximă la *p*H între 3,5 şi 8,0, iar curbele ei de activitate sunt funcţie de *p*H pentru enzimele izolate din mai multe genuri de microorganisme şi prezintă o porţiune aproape plată între *p*H 4,5 şi 7.

De exemplu, glucozoxidaza obţinută din *Aspergillus niger* are masa moleculară 160 000 Da, optimum de activitate între 5,5 şi 6,5 şi punctul izoelectric situat la *p*H = 4,02.

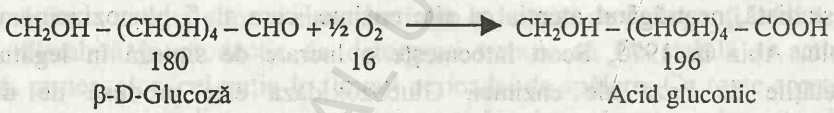
Glucozoxidaza este o enzimă înalt specifică, ce oxidează cu viteză mare forma β-D-a glucozei. Oxidarea glucozei este însă cantitativă datorită faptului că glucozoxidaza este însoţită de obicei de aldozmutarotază (E.C. 5.1.3.3), care restabileşte în permanenţă echilibrul α-D-glucoză → β-D-glucoză.

Oxidarea glucozei are loc cu formare de D-glucono-1,5-lactonă şi apă oxigenată.

În preparatele brute şi în cele puţin purificate, glucozoxidaza este însoţită de catalază care descompune apa oxigenată în apă şi oxigen, care participă din nou în reacţie.



Astfel, reacţia globală devine:



Specificitatea glucozoxidazei este foarte mare, forma β a glucozei fiind oxidată de 160 ori mai rapid decât forma α.

Referitor la substrat, Pazur şi Kleppe (1965) au arătat că numai 2-deoxy-D-glucoza şi 6-deoxy-D-glucoza mai sunt oxidate de glucozoxidază cu o viteză de numai 10% din cea de oxidare a D-glucozei.

Glucozoxidaza este enzima care catalizează reacţia de oxidare a glucozei la acid gluconic. Obţinerea acidului gluconic prin biosinteză şi a sărurilor sale (de Ca, Na, Mg, Fe etc.) presupune, mai întâi, obţinerea glucozoxidazei şi apoi transformarea enzimatică a glucozei în acid gluconic. Procedeul nu implică însă obţinerea enzimei într-o formă purificată, fiind suficientă prezenţa acesteia în lichidul de cultură sau în biomasa produsă special în acest scop.

Formarea acidului gluconic prin oxidarea microbiologică a glucozei a fost comunicată prima dată de Boutroux acum 110 ani. El a observat că o cultură de *Acetobacter aceti* transformă glucoza într-un acid nevolatil care la început a fost considerat drept acid lactic şi apoi identificat a fi acid gluconic.

În anul 1922, Molliard a constatat formarea acidului gluconic prin oxidarea zaharozei prin intermediul unui mucegai *Aspergillus niger*. Ulterior, Bernhauer a izolat o tulpină de *Aspergillus niger* care avea capacitatea de a produce acid

gluconic, respectiv gluconat de calciu, cu randament ridicat, prin oxidarea glucozei, în prezența carbonatului de calciu. El a elaborat un proces de obținere a gluconatului de calciu în două trepte: microorganismul a fost cultivat pe un mediu nutritiv, conținând glucoză, peptonă, fosfat monopotasic, sulfat de magneziu și clorură de calciu. Cultura obținută a fost utilizată pentru transformarea glucozei în acid gluconic, în absența sărurilor nutritive. Ulterior, s-a neutralizat acidul și s-a izolat gluconatul de calciu.

În general, sărurile acidului gluconic (de calciu, de sodiu) se obțin prin neutralizarea acidului gluconic cu o sare (de obicei $CaCO_3$, Na_2CO_3) sau cu baze ($Ca(OH)_2$, NaOH). La rândul său, acidul gluconic se obține prin oxidare chimică, electrochimică sau biochimică a glucozei.

Avantajul metodei biochimice, față de cele chimice și electrochimice, constă în faptul că oxidarea enzimatică este specifică, astfel încât produsele secundare sunt prezente în cantitate mult mai mică, ceea ce contribuie la ușurarea procesului de izolare și purificare și mărește randamentul de oxidare a glucozei la acid gluconic. În plus, condițiile de reacție sunt mult mai blânde.

Oxidarea biochimică a glucozei la acid gluconic poate avea loc în două moduri:

– se cultivă un microorganism producător de glucozoxidază, pe un mediu de cultură, conținând cca 20–30% glucoză și săruri minerale. Acidul gluconic format pe parcursul fermentației se neutralizează pe măsură ce se formează pentru a împiedica cristalizarea gluconatului respectiv. La sfârșitul bioprocesului se separă biomasa, obținându-se o soluție nativă conținând un amestec de acid gluconic și sarea acestuia (de Ca, Na etc.). În această variantă de lucru, concentrația inițială mare a glucozei conduce la formarea unei cantități mici de biomasă, dar aceasta posedă o activitate glucozoxidazică suficientă pentru a produce oxidarea glucozei din mediul de cultură. Acest mod de oxidare a glucozei, în prezența celulelor unui microorganism, se numește *oxidare microbiologică a glucozei*;

– se cultivă un microorganism producător de glucozoxidază, pe un mediu de cultură specific producției de enzimă, conținând cca 5–10% glucoză și săruri minerale. În acest caz, se dezvoltă o cantitate mare de biomasă cu activitate glucozoxidazică. La sfârșitul fermentației se separă biomasa și se prelucrează în scopul extracției glucozoxidazei. Preparatele de glucozoxidază, cu diferite grade de puritate, pot fi utilizate, ulterior, la oxidarea unor soluții de glucoză de diferite concentrații. În acest caz, procesul de oxidare a glucozei cu ajutorul enzimei eliberate de microorganism se numește *oxidarea enzimatică a glucozei.*

Oxidarea glucozei la acid gluconic, prin utilizarea de preparate de glucozoxidază imobilizată sau de glucozoxidază și catalază co-imobilizate pe diferite suporturi, permite realizarea procesului în bioreactoare cu regim de lucru

continuu. Aşa, de exemplu, dacă se tratează zahăr invertit sau sirop de glucoză cu o concentraţie mare în fructoză cu glucozoxidază, se obţine un amestec de fructoză şi acid gluconic care sunt uşor separate prin cromatografie pe schimbători de ioni, iar în condiţiile folosirii de glucozoxidază şi catalază co-imobilizate, siropul de glucoză este relativ uşor de transformat în acid gluconic, într-un regim de lucru continuu.

18.2. MICROORGANISME PRODUCĂTOARE DE GLUCOZOXIDAZĂ

Glucozoxidaza este o enzimă produsă în cantităţi mari de diferite microorganisme, în special de fungi: *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium amagasakiense* şi *Penicillium purpuragenum* sau unele bacterii ca *Acetobacter oxydans*, *Acetobacter gluconicum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas ovalis*. Obţinerea şi izolarea glucozoxidazei din *A. niger* este cea mai eficientă, enzima produsă de tulpinile acestui microorganism fiind cel mai intens studiată.

Fungii aparţinând genului *Aspergillus* sunt alături de cei din genul *Penicillium*, cele mai importante microorganisme folosite în biotehnologiile de obţinere a enzimelor. Fungii filamentoşi invadează substraturile solide, secretă enzime degradative, conducând în cele din urmă la descompunerea şi transformarea substratului pe care se dezvoltă. Din punct de vedere taxonomic, fungii, microorganisme eucariote, pot fi încadrate după clasificarea dată în *Biology of Industrial Microorganisms* de A. L. Demain şi N. A. Solomon (1985) în:

- diviziunea *Anastigomycotina*;
- subdiviziunea *Deuteromycotina*;
- clasa *Deuteromycetes*;
- subclasa *Hypomycotidae*;
- ordinul *Moniliales*;
- familia *Moniliaceae*;
- genul *Aspergillus*.

Majoritatea speciilor din genul *Aspergillus* prezintă miceliu septat, au un ciclu de viaţă sexuat şi sunt denumiţi în mod obişnuit „fungi imperfecţi". Unii autori îi încadrează şi la fungi perfecţi datorită prezenţei ciclului de viaţă parasexual. Acesta este un ciclu ambiguu, asemănător cu cel sexual, în special în etapa de recombinare a materialului genetic, cu menţiunea că recombinarea nu are loc în meioză ci în cursul diviziunii mitotice.

Figura 18.1 prezintă schematic structura aparatului conidial asexuat. Conidioforii sunt formaţiuni verticale care iau naştere din miceliu vegetativ sau, altfel spus, reprezintă nişte hife alungite care au o extremitate superioară globulară, multinucleată şi o extremitate inferioară neseparată de celula-mamă, denumită celulă bazală. Conidioforul este format din celula de bază, tulpină şi veziculă. Pe veziculă sunt dispuse unul sau două rânduri de celule fertile denumite sterigme.

Celulele fertile pot acoperi fie parţial, fie integral suprafaţa veziculei.

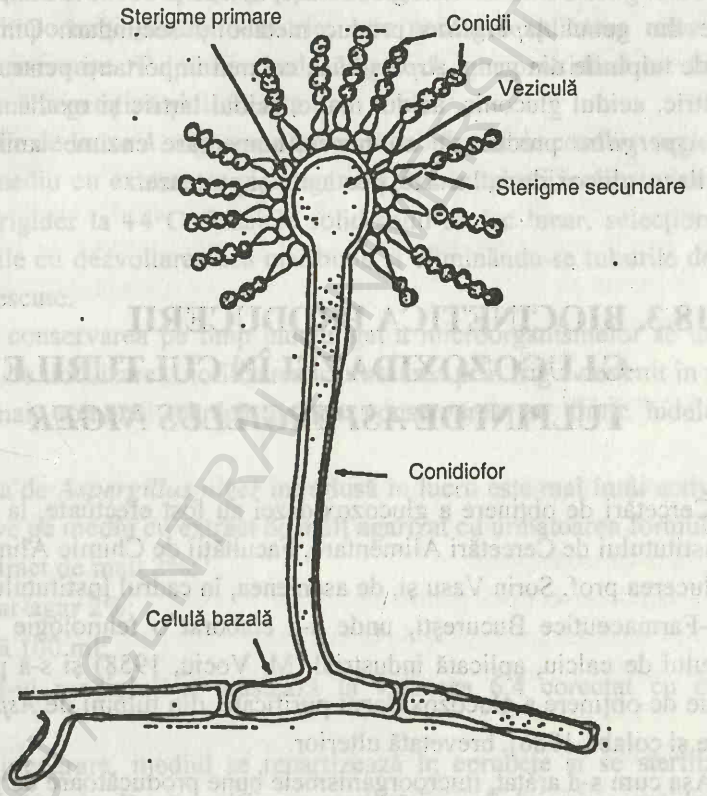


Fig. 18.1. Reprezentarea schematică a unui aparat conidial de *Aspergillus*.

Nucleii sterigmelor se divid mitotic şi migrează spre extremitate. Se formează apoi peretele despărţitor care separă nucleul sau nucleii de citoplasmă, diferenţiindu-se în entităţi conidiosporale mature. Procesul se repetă, conducând astfel la un şir lung de conidiospori. Întregul lanţ de conidii poartă zestrea genetică a sterigmelor. La speciile cu spori uninucleaţi, lanţul de conidii formează o clonă.

Prin cultivare pe mediu Czapek-agarizat, la temperatura de 26°C, se formează după 2 săptămâni colonii, având un diametru de 3,0–4,5 cm, uşor

încreţite radiar, constând dintr-un miceliu bazal alb, care la majoritatea tulpinilor se extinde cu 0,2–1 cm în afara ariei centrale a coloniei foarte abundent sporulată şi care formează o zonă de miceliu alb cu margini neregulate şi textură granulară. Colonia nu formează exsudat şi prezintă un miros slab caracteristic. Conidioforii sunt mai abundenţi în zona centrală a coloniei, iar culoarea conidiilor variază de la brun deschis la negru. Lungimea conidioforilor este de obicei de 1,0 – 2,5 – 4 mm şi 10–20 mm în diametru, adesea subţiaţi chiar sub veziculă. Vezicula globuloasă are 45 – 60/80 – 85 μ în diametru. Sterigmele primare sunt rotunde, iar cele secundare sunt alungite. Conidiile sunt globuloase, netede şi devin la maturitate rugoase. Tulpinile din genul *Aspergillus* produc metaboliţi secundari. Dintre metaboliţii produşi de tulpinile din genul *Aspergillus*, cei mai importanţi pentru industrie sunt acidul citric, acidul gluconic, acidul malic, acidul tartric şi oxalic. Reprezentanţii genului *Aspergillus* produc, de asemenea, numeroase enzime: amilaze, catalaze, glucoamilaze, glucoxidaze, lactaze, pectinaze şi proteaze.

18.3. BIOCINETICA PRODUCERII GLUCOZOXIDAZEI ÎN CULTURILE CU TULPINI DE *ASPERGILLUS NIGER*

Cercetări de obţinere a glucozoxidazei au fost efectuate, la noi în ţară, în cadrul Institutului de Cercetări Alimentare, Facultăţii de Chimie Alimentară Galaţi, sub conducerea prof. Sorin Vasu şi, de asemenea, în cadrul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice Bucureşti, unde s-a elaborat o tehnologie de obţinere a gluconatului de calciu, aplicată industrial (M. Vociu, 1958) şi s-a pus la punct o tehnologie de obţinere a glucozoxidazei purificate, din tulpini de *Aspergillus niger* [Jurcoane şi colab., 1986], brevetată ulterior.

Aşa cum s-a arătat, microorganismele bune producătoare de glucozoxidază sunt considerate fungii din genul *Aspergillus*. Aceste microorganisme pot fi cultivate în condiţii de laborator şi de pilot industrial (sau în fermentatoare de diferite tipuri), cu o dezvoltare rapidă pe medii lichide. Prezintă o sporulare intensă pe medii solide şi sintetizează rapid glucozoxidaza intracelulară. În plus, coloniile sunt viguroase şi rezistente la infecţii cu microorganisme străine.

În continuare, prezentăm procedeul de obţinere şi purificare a glucozoxidazei cu o tulpină de *Aspergillus niger* var. *phoenicis*, elaborat şi brevetat de colectivul ICCF în anul 1995 [Jurcoane şi colab.].

În scopul obținerii glucozoxidazei, s-a folosit ca microorganism producător o tulpină de *Aspergillus niger* var. *phoenicis* înregistrată în colecția de microorganisme a Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice sub nr.19 sau tulpina *Aspergillus niger* MIUG 55, din colecția Facultății de Chimie Alimentară din Universitatea Galați.

18.3.1. Întreținerea și conservarea tulpinilor de *A. niger*

Pentru păstrarea viabilității și a potențialului de biosinteză a producătorilor de metaboliți importanți pentru industrie, este necesară aplicarea unor metode adecvate de conservare. Tulpinile producătoare de glucozoxidază au fost conservate sub formă vegetativă și liofilizată.

Tulpinile de lucru *A. niger* se păstrează sub formă de conserv vegetativ, ca subculturi pe mediu cu extract de malț agarizat 2% în tuburi înclinate incubate la 30...31°C în frigider la +4°C. Pasajele solid-solid se fac lunar, selecționându-se totodată culturile cu dezvoltarea cea mai bună și eliminându-se tuburile de culturi atipice, slab crescute.

Pentru conservarea pe timp îndelungat a microorganismelor se utilizează metoda clasică de liofilizare. Liofilizarea sau uscarea prin frig a devenit în ultimele decenii cea mai comună tehnică pentru conservarea pe timp îndelungat a ciupercilor.

Tulpina de *Aspergillus niger* introdusă în lucru este mai întâi activată prin treceri succesive pe mediu cu extract de malț agarizat cu următoarea formulă:

- extract de malț 2%;
- agar-agar 2%;
- apă 100 ml;
- *p*H-ul mediului se ajustează la valoarea 6,4 corectat cu o soluție NaOH 40%.

După preparare, mediul se repartizează în eprubete și se sterilizează la 110°C, timp de 30 min. După verificarea sterilității mediului prin menținerea sa la termostat la 37°C, timp de 48 ore, acesta se însămânțează cu suspensia de spori din fiola de liofilizare.

Eprubetele cu mediu însămânțat sunt incubate la 30...31°C, timp de 7 zile. La sfârșitul perioadei de incubare, eprubetele sunt examinate în privința gradului de sporulare al culturii precum și a purității acesteia. Eprubetele cu culturi corespunzătoare se selecționează în vederea lucrărilor ulterioare, fiind conservate la frigider (+4°C). Acestea constituie cultura de întreținere.

18.3.2. Prepararea inoculului pe mediu solid

Inoculul pe mediu solid se obţine pornind de la cultura vegetativă de *A. niger* MIUG 55, sau *A. niger* ICCF-19 care serveşte ca material de însămânţare a mediului.

Mediul de inocul solid se prepară din 2% extract de malţ, 2% agar-agar completat la 100 ml apă comună. Se corectează *p*H-ul mediului la 6,4 cu NaOH 40%.

Mediul astfel preparat în flacoane Erlenmeyer de 750 ml, se sterilizează la 110°C timp de 30 min, se răceşte şi apoi se menţine timp de 24–28 ore la 37°C pentru evaporarea condensului format. Mediul de cultură se însămânţează cu 2 ml suspensie de spori obţinută prin adăugarea a 10 ml de apă distilată sterilă peste cultura de întreţinere bine sporulată. După însămânţare, suspensia de spori se împrăştie uniform pe întreaga suprafaţă a mediului, care se incubează la termostat, la temperatura de 30...31°C, timp de 7 zile pentru sporulare. După această perioadă, sporii se pot utiliza imediat sau se pot conserva la frigider la +4°C. Cultura de inocul pe mediu solid, bine sporulată, serveşte la însămânţarea mediului de fermentaţie.

18.3.3. Dezvoltarea inoculului vegetativ

Inoculul vegetativ din cultura de *Aspergillus niger* serveşte ca material de însămânţare a mediului de fermentaţie utilizat în obţinerea biomasei miceliene îmbogăţită în glucozoxidază.

Mediul de cultură pentru obţinerea inoculului vegetativ conţine în g la 100 ml apă: glucoză (dextroză) 6 (ca substanţă reducătoare), carbonat de calciu 1, azotat de sodiu 1, sulfat de magneziu 0,05, fosfat monopotasic 0,05, fosfat bipotasic 0,05, clorură de potasiu 0,05, *p*H-ul mediului înainte de sterilizare 6–6,5 şi se sterilizează la 110°C, 20 min. Inoculul se dezvoltă în condiţii de agitare şi aerare continuă, timp de 26–30 de ore.

18.3.4. Faza de bioproces

Pentru faza de regim, se prepară un mediu de cultură având în compoziţie: glucoză 8% (ca substanţă reducătoare), azotat de sodiu, fosfat monopotasic, sulfat de magneziu, fosfat diamoniacal, peptonă, $CaCO_3$.

În faza de bioproces, lucrările s-au efectuat în sistem submers în bioreactoare de 150 l capacitate totală, încărcate cu 70 l mediu de cultură.

Prepararea mediului de biosinteză se face astfel: se dizolvă mai întâi glucoza în apă încălzită la 60...70°C şi apoi se adaugă sărurile (fără carbonat de calciu), ulei vegetal (ca antispumant). Mediul astfel preparat se introduce în bioreactor (sterilizat în prealabil) şi se sterilizează timp de 20 min, la 110°C.

Carbonatul de calciu se suspendă separat în 5000 ml apă potabilă şi se sterilizează în flacoane Erlenmeyer (câte 500 g $CaCO_3$ pe flacon de 750 ml) la 120°C, timp de o oră.

Mediul de biosinteză sterilizat şi răcit la 35°C se însămânţează fie cu o suspensie de spori (aproximativ 500 ml) colectată de pe 5 flacoane Erlenmeyer cu suprafaţă de spori (inocul pe mediu solid dezvoltat în laborator), fie cu 7 litri mediu de inocul vegetativ pregătit cum s-a arătat anterior.

În momentul însămânţării se introduce în bioreactor şi suspensia de carbonat de calciu sterilă, bine agitată, reprezentând 20% din cantitatea totală necesară (un flacon cu 500 g $CaCO_3$). Restul de $CaCO_3$ se adaugă pe parcursul bioprocesului, în cazul în care scade *p*H-ul.

După inoculare, se stabileşte regimul de lucru şi anume:

- presiunea în vas: 1 bar;
- debitul de aer: 0,7 l aer/l mediu/min;
- turaţia agitatorului: 280 rot/min;
- temperatura: 35°C;
- *p*H = 5.

Pentru urmărirea bioprocesului, se scot probe de mediu din 8 în 8 ore şi se determină:

- concentraţia glucozei;
- *p*H-ul;
- aspectul microorganismului;
- gluconatul de calciu;
- activitatea glucozoxidazică a mediului;
- activitatea glucozoxidazică a miceliului.

Dacă *p*H-ul scade sub valoarea 4, se adaugă câte un flacon cu $CaCO_3$ pentru corecţie.

Se trasează curba scăderii concentraţiei glucozei. Când aceasta intră în faza asimptotică, atingând valoarea 1–1,2 % în mediu, bioprocesul se întrerupe. Fermentaţia durează 36–40 de ore din momentul însămânţării.

Variaţia parametrilor biochimici, pe parcursul biosintezei glucozoxidazei, se poate urmări în figura 18.2.

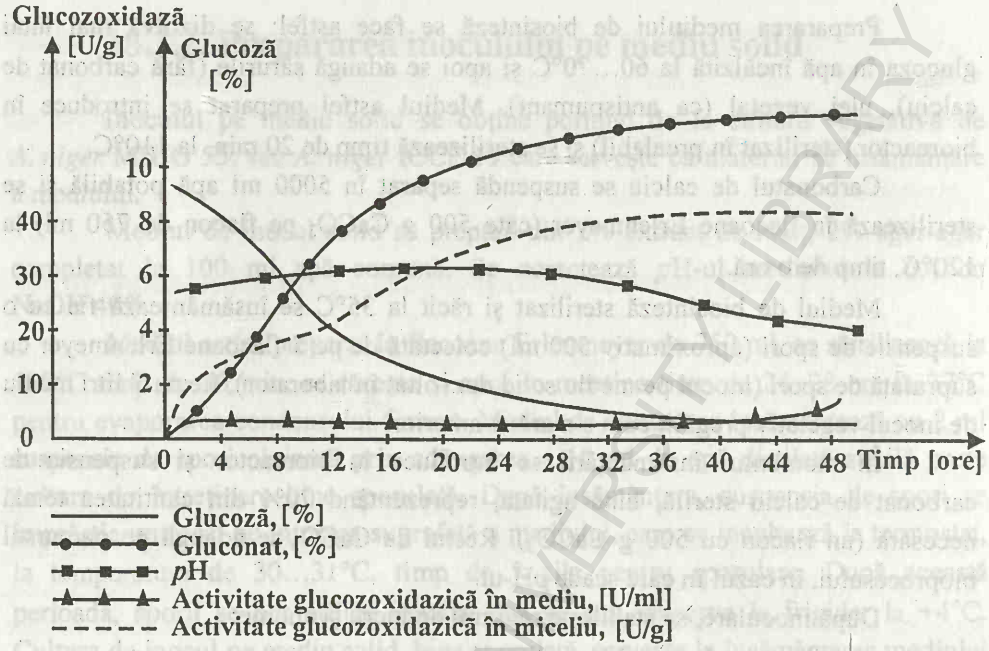


Fig. 18.2. Biocinetica producerii glucozoxidazei cu tulpina *Aspergillus niger* ICCF.

18.4. EXTRACȚIA ȘI IZOLAREA GLUCOZOXIDAZEI DIN MICELII DE *ASPERGILLUS NIGER*

Glucozoxidaza este o enzimă intracelulară, astfel încât după biosinteză cu tulpini de *Aspergillus niger* se impune necesitatea separării biomasei cu activitate glucozoxidazică din mediul de fermentație.

Este cunoscut faptul că separarea biomasei fungice nu ridică probleme deosebite, astfel că filtrarea sub vacuum, pe strat de Perlită (adjuvant de filtrare), se desfășoară în bune condiții. Miceliul se spală de pe filtru cu două volume (vol/vol) apă distilată raportată la volumul de mediu filtrat.

Miceliul separat din lichidul de cultură prin filtrare și spălat cu apă distilată este supus operației de spargere a pereților celulari în vederea eliberării enzimei.

Descriem în continuare procedeul de extracție și purificare a glucozoxidazei stabilit de colectivul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice București [Jurcoane și colab.].

Pentru spargerea pereților celulari, miceliul umed a fost prelucrat prin mojarare cu nisip de cuarț în raport 1: 0.3 (*g/g*) timp de 30 min.

Extracția enzimei s-a realizat în apă distilată, timp de 24 de ore, la 4°C, cu agitare intermitentă. Raportul de extracție a fost 1:5 (*g/v*) (gram miceliu/volum mediu de extracție).

Extractele enzimatice brute obținute s-au utilizat în experiențele de purificare ulterioare.

18.5. PURIFICAREA PREPARATELOR ENZIMATICE CU ACTIVITATE GLUCOZOXIDAZICĂ

Literatura de specialitate indică, în general, pentru purificarea glucozoxidazei metode cromatografice, pe schimbători de ioni de natură celulozică și anume dietilaminoetil-celuloza (DEAE-celuloza). Astfel, Barton Richard reține glucozoxidaza pe DEAE-celuloză la *p*H = 4,5, coloana fiind echilibrată cu tampon acetat 0,05 m. Pentru îndepărtarea impurităților, coloana s-a eluat cu tampon acetat 0,01 m la *p*H = 4,5. Pentru a elua glucozoxidaza de pe coloană, s-a utilizat un tampon acetat 0,1 n la *p*H = 3,7.

Redăm în continuare modul de purificare a glucozoxidazei obținute prin extracție din biomasă micelian de *Aspergillus niger*, prin adsorbție pe DEAE-Sephacel (varietate de DEAE-celuloză cu dimensiunea porilor de 40–50 μm).

DEAE-Sephacel spălată în apă s-a amestecat cu 3 părți etanol 96%, s-a lăsat să sedimenteze, iar supernatantul alcool a fost decantat. S-a repetat spălarea cu NaOH 0,5 n, după care schimbătorul s-a spălat cu apă distilată până la neutralizare. Schimbătorul celulozic astfel pregătit a fost introdus într-o coloană 5 x 25 cm, fiind utilizată la adsorbția glucozoxidazei.

Soluția de glucozoxidază rezultată după filtrarea miceliului, reunită cu apa (1 volum) de spălare și concentrată de 5 ori, s-a filtrat pe hârtia de filtru bandă albastră și apoi s-a trecut pe coloana DEAE-Sephacel. Viteza de curgere a fost de 50 ml/oră. S-au colectat probe de 25 ml, în care s-a determinat activitatea glucozoxidazică, *p*H-ul și conținutul proteic. Eluția enzimei de pe coloană s-a efectuat cu soluție tampon acetat 1 m, *p*H = 3,5. S-au colectat probe de 25 ml cu viteza de 50 ml/h.

În probele recoltate, s-au determinat activitatea glucozoxidazică, *p*H-ul și conținutul în proteină.

În figura 18.3 se redă curba de eluție a glucozoxidazei de pe coloana cu DEAE-Sephacel (cu tampon acetat 1 m, *p*H = 3,5).

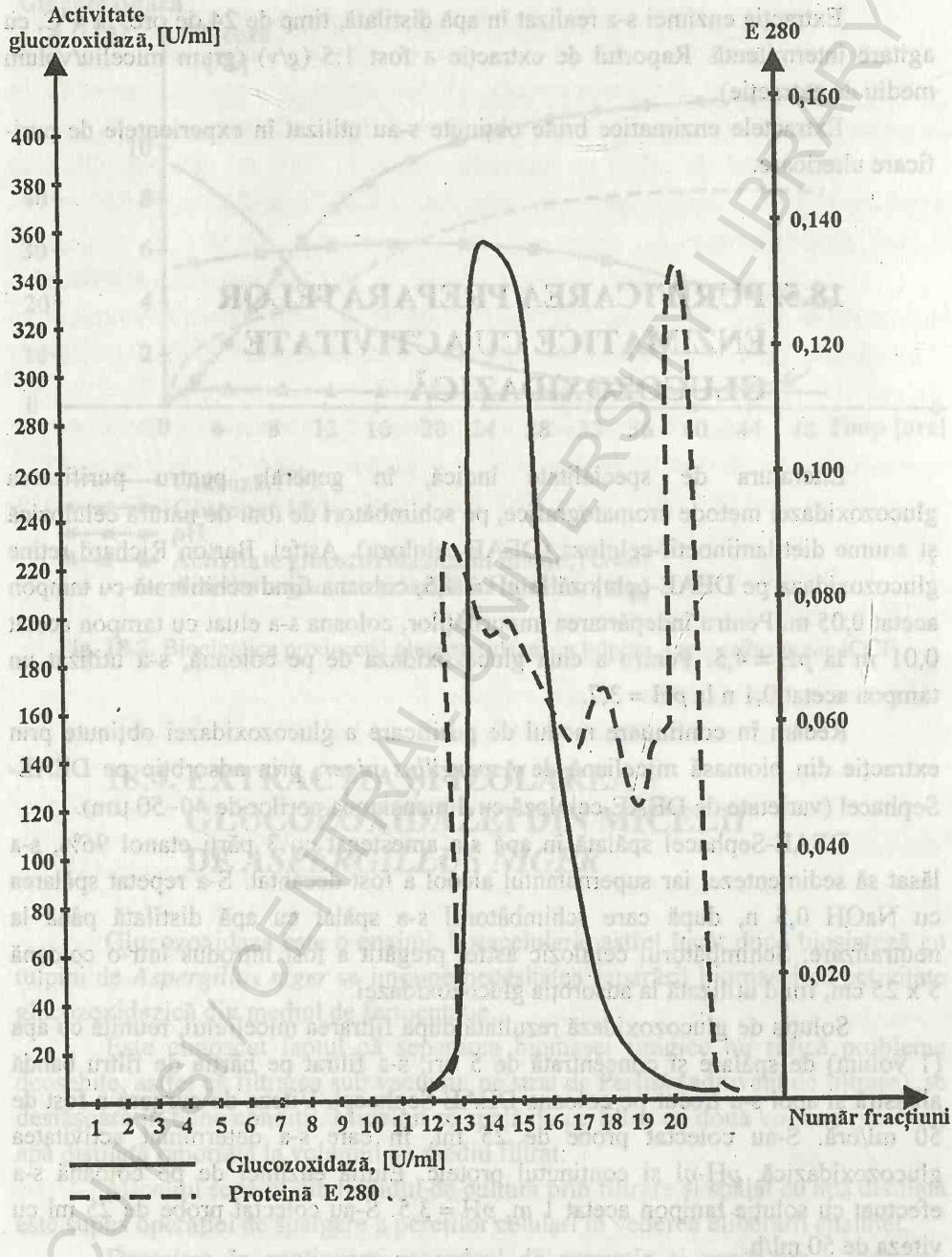


Fig. 18.3. Curba de eluție a glucozoxidazei de pe coloana cu DEAE-Sephacel (cu tampon acetat 1m, *p*H = 3,5).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

18.6. CONDIȚIONAREA PRIN LIOFILIZARE A PREPARATELOR ENZIMATICE DE GLUCOZOXIDAZĂ

În scopul obținerii unor preparate enzimatice stabile, soluțiile de glucozoxidază rezultate în urma procesului de purificare pe coloane cu DEAE-celuloză sunt supuse unor operații de condiționare specifice. Astfel, probele de glucozoxidază eluate de pe coloana de DEAE-Sephacel se supun operației de dializă, în scopul eliminării ionilor prezenți în tamponul acid acetic-acetat, utilizat la eluția enzimei de pe coloană. Dializa s-a realizat față de apă distilată, timp de 24 de ore la 4°C. După dializă, *p*H-ul soluției are valoarea 5, față de 3,5, înregistrat după eluarea enzimei din coloană.

Soluția obținută după dializă se supune operației de liofilizare, în prezență de 0,1% polietilenglicol cu grad de polimerizare 4000 (PEG-4000) și se obține un preparat glucozoxidazic, de culoare galben pai, cu activitate de aproximativ 60 U/mg.

18.7. PROPRIETĂȚILE GLUCOZOXIDAZEI DIN TULPINI DE *ASPERGILLUS NIGER*

Temperatura optimă de acțiune a glucozoxidazei din tulpina *A.niger* ICCF. Temperatura optimă de activitate a glucozoxidazei s-a urmărit determinând activitatea la diferite temperaturi (20...70°C), la *p*H = 5,6 (fig. 18.4) în condițiile metodei de dozare. Activitatea glucozoxidazei produsă de tulpina *Aspergillus niger* ICCF este maximă la temperatura de 50°C. Peste această temperatură, activitatea scade brusc, enzima inactivându-se.

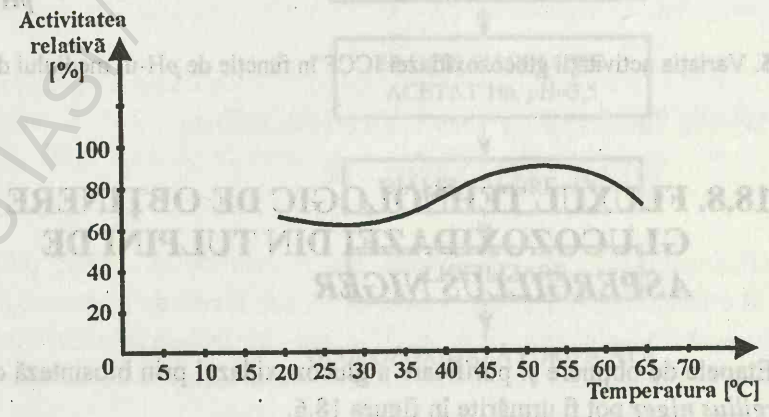


Fig. 18.4. Curba de variație a activității glucozoxidazei ICCF în funcție de temperatură.

În intervalul 20...32°C, activitatea glucozoxidazică este practic constantă. În general, intervalul de temperatură la care este utilizată glucozoxidaza este de 20...40°C, observându-se o variație mică a activității la aceste temperaturi.

Variația activității glucozoxidazei în funcție de *p*H. *p*H-ul optim de acțiune al glucozoxidazei ICCF s-a urmărit în intervalul de *p*H = 3–8. În acest sens, soluția de glucoză care constituie substratul folosit s-a adus la diferite valori de *p*H, cuprinse în intervalul menționat, iar după o preincubare de 5 min la 35°C s-a adăugat enzima (dizolvată în soluții tampon de același *p*H cu soluția substratului) și s-a incubat timp de 2 min, determinându-se activitatea în condițiile metodei de dozare.

După cum reiese din figura 18.5, *p*H-ul optim de acțiune al glucozoxidazei ICCF este 4,5–5.

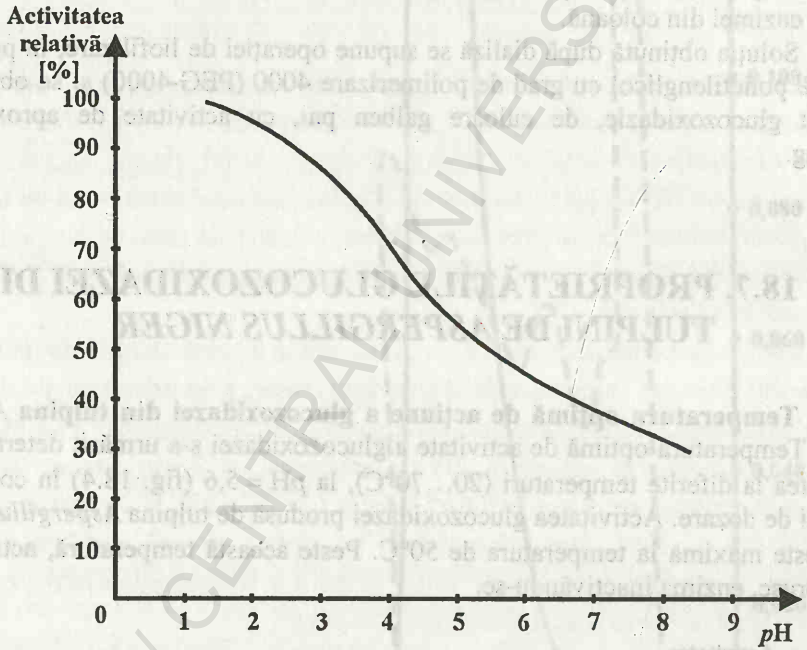


Fig. 18.5. Variația activității glucozoxidazei ICCF în funcție de *p*H-ul mediului de reacție.

18.8. FLUXUL TEHNOLOGIC DE OBȚINERE A GLUCOZOXIDAZEI DIN TULPINI DE *ASPERGILLUS NIGER*

Etapele de obținere și purificare a glucozoxidazei prin biosinteză cu tulpini de *Aspergillus niger* pot fi urmărite în figura 18.6.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

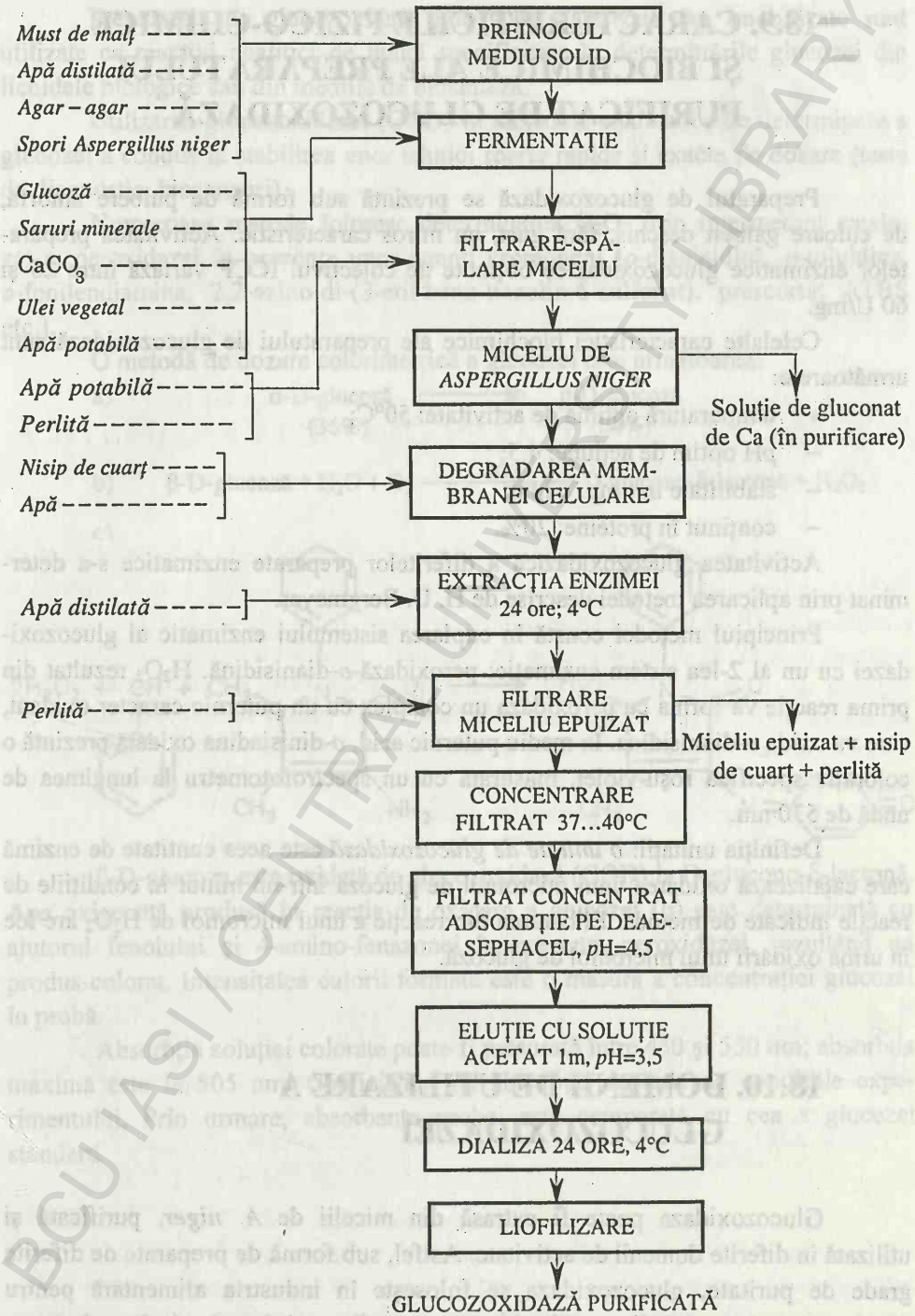


Fig. 18.6. Fluxul tehnologic de obținere al glucozoxidazei.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

18.9. CARACTERISTICILE FIZICO-CHIMICE ŞI BIOCHIMICE ALE PREPARATULUI PURIFICAT DE GLUCOZOXIDAZĂ

Preparatul de glucozoxidază se prezintă sub formă de pulbere amorfă, de culoare galben deschis, fără gust, cu miros caracteristic. Activitatea preparatelor enzimatice glucozoxidazice obţinute de colectivul ICCF variază între 20 şi 60 U/mg.

Celelalte caracteristici biochimice ale preparatului de glucozoxidază sunt următoarele:

- temperatură optimă de activitate: 50°C;
- *p*H optim de acţiune: 4,5;
- stabilitate în timp: 6 luni;
- conţinut în proteine: 20%.

Activitatea glucozoxidazică a diferitelor preparate enzimatice s-a determinat prin aplicarea metodei descrise de H. U. Bergmeyer.

Principiul metodei constă în cuplarea sistemului enzimatic al glucozoxidazei cu un al 2-lea sistem enzimatic: peroxidază-*o*-dianisidină. H_2O_2 rezultat din prima reacţie va forma cu peroxidaza un complex cu un puternic caracter oxidant, care va oxida *o*-dianisidina. În mediu puternic acid, *o*-dinisiadina oxidată prezintă o colorație specifică roşu-violet, măsurată cu un spectrofotometru la lungimea de undă de 530 nm.

Definiţia unităţii: *o unitate de glucozoxidază* este acea cantitate de enzimă care catalizează oxidarea unui micromol de glucoză într-un minut în condiţiile de reacţie indicate de metodă. Eliberarea din reacţie a unui micromol de H_2O_2 are loc în urma oxidării unui micromol de glucoză.

18.10. DOMENII DE UTILIZARE A GLUCOZOXIDAZEI

Glucozoxidaza poate fi extrasă din micelii de *A. niger,* purificată şi utilizată în diferite domenii de activitate. Astfel, sub formă de preparate de diferite grade de puritate, glucozoxidaza se foloseşte în industria alimentară pentru eliminarea oxigenului din cutiile de conserve, din recipientele de bere îmbuteliată, fiind considerat cel mai bun antioxidant biochimic.

Preparatele de glucozoxidază purificată stabilizate sau imobilizate sunt utilizate ca reactivi analitici de înaltă specificitate în determinările glucozei din lichidele biologice sau din mediile de biosinteză.

Utilizarea glucozoxidazei (GOD) în metodele enzimatice de determinare a glucozei a condus la stabilirea unor tehnici foarte rapide şi exacte de dozare (teste de diagnostic, biosenzori).

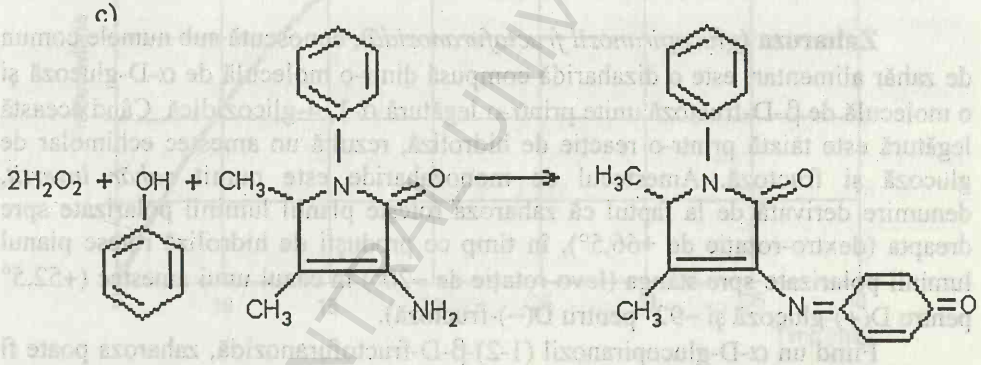
Numeroase metode folosesc determinarea H_2O_2 prin intermediul catalazei şi peroxidazei în prezenţa unor agenţi cromogeni [*o*-dianisidină, *o*-toluidina, *o*-fenilendiamina, 2,2-azino-di-(3-etil-benz-tiazolin-6-sulfonat), prescurtat ATBS etc.].

O metodă de dozare colorimetrică a glucozei este următoarea:

a) α-D-glucoză (36%) ⟶ β-D-glucoză (64%)

b) β-D-glucoză + H_2O + O_2 $\xrightarrow{GOD}$ D-glucono-δ-lactonă + H_2O_2

c)



β-D-glucoza este oxidată de glucozoxidază (GOD) la D-glucono-δ-lactonă. Apa oxigenată produsă în reacţia de oxidare a glucozei (b) este determinată cu ajutorul fenolului şi 4-amino-fenazonei în prezenţa peroxidazei, rezultând un produs colorat. Intensitatea culorii formate este o măsură a concentraţiei glucozei în probă.

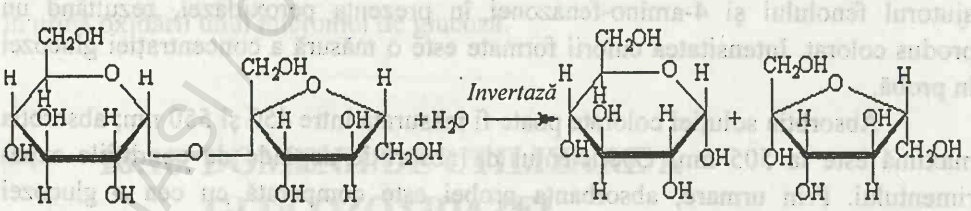
Absorbţia soluţiei colorate poate fi măsurată între 450 şi 550 nm; absorbţia maximă este la 505 nm. Coeficientul de absorbţie depinde de condiţiile experimentului. Prin urmare, absorbanţa probei este comparată cu cea a glucozei standard.

19. INVERTAZA

19.1. GENERALITĂȚI; CONVERSIA ENZIMATICĂ A ZAHAROZEI

Zaharoza (*glucopiranozil fructofuranozidă*), cunoscută sub numele comun de zahăr alimentar, este o dizaharidă compusă dintr-o moleculă de α-D-glucoză şi o moleculă de β-D-fructoză unite printr-o legătură α-1, 4-glicozidică. Când această legătură este tăiată printr-o reacţie de hidroliză, rezultă un amestec echimolar de glucoză şi fructoză. Amestecul de monozaharide este numit *zahăr invertit*, denumire derivată de la faptul că zaharoza roteşte planul luminii polarizate spre dreapta (dextro-rotaţie de +66,5°), în timp ce produşii de hidroliză rotesc planul luminii polarizate spre stânga (levo-rotaţie de −20°) în cazul unui amestec (+52,5° pentru D(+)-glucoză şi −92° pentru D(−)-fructoză).

Fiind un α-D-glucopiranozil (1-2)-β-D-fructofuranozidă, zaharoza poate fi hidrolizată atât de α-D-glucozidază (hidroliza unităţilor terminale de glucoză), cât şi de β-fructofuranozidaze.



Zaharoză Glucoză Fructoză

Invertaza este o β-fructofuranozidază (EC 3.2.1.26) ce hidrolizează zaharoza la fel ca şi pe alţi β-fructani, cum ar fi rafinoza. Este întâlnită în literatură sub diferite denumiri, cum ar fi: sucrază, invertin, zaharază. Trebuie menţionat că zaharoza poate fi hidrolizată relativ uşor şi în absenţa invertazei, dar în condiţii de reacţie acide.

BCU IAŞI / CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

Invertaza este o glicoproteină alcătuită din 532 aminoacizi ce conţin două subunităţi proteice identice de aproximativ 61 kDa, cu o structură oligozaharidică asemănătoare cu cea a manozei. Gena ce codifică invertaza la specia *Saccharomyces cerevisiae* este *SUC2*.

Determinarea activităţii invertazice se poate realiza pe mai multe căi. Probabil ca cea mai simplă este efectuarea testului semicantitativ al glucozei cu ajutorul kiturilor enzimatice de tipul Roche Diabur (2000) sau Clinistix, care detectează apariţia glucozei în mediu. O altă metodă foarte utilizată este dozarea cu ajutorul acidului dinitro-salicilic (DNS) (Montesinos ş.a., 1965). Metoda necesită un spectofotometru ce poate măsura la lungime de unda de 540 nm. O unitate de invertază reprezintă cantitatea de enzimă ce hidrolizează 1 mmol zaharoză/min la 60°C şi *p*H = 5,0.

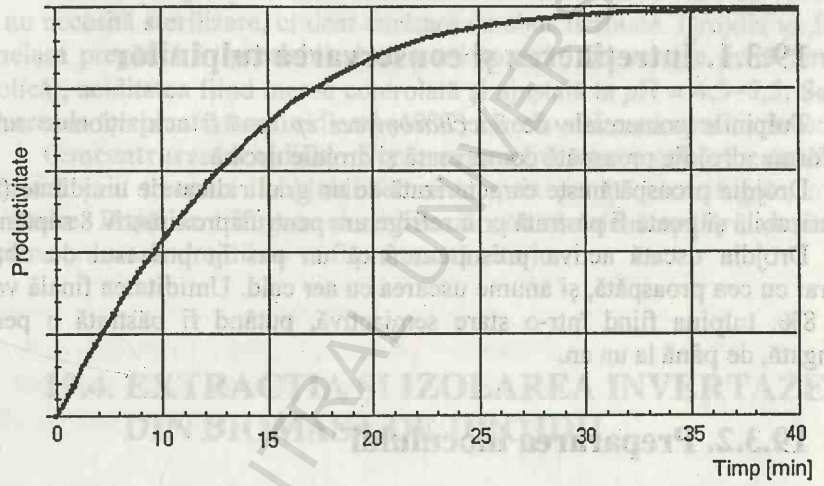


Fig. 19.1. Activitatea invertazică în funcţie de timp.

Reprezentând grafic concentraţia produsului de reacţie funcţie de timp se observă o creştere liniară în primul segment, iar rata formării produsului începe să scadă la 40 de minute după iniţierea reacţiei (fig. 19.1).

19.2. MICROORGANISME PRODUCĂTOARE DE INVERTAZĂ

Un număr relativ ridicat de microorganisme produc invertază, deci pot utiliza zaharoza ca nutrient. Comercial, invertaza este biosintetizată în primul rând cu tulpini de drojdii de *Saccharomyces cerevisiae* şi *Saccharomyces carlsbergensis*. Chiar şi în cadrul aceleiaşi culturi de drojdii, invertaza apare în mai

multe forme. De exemplu, invertaza intracelulară are o masă moleculară de 135 000 Daltoni, iar cea extracelulară are masa moleculară de 270 000 Daltoni.

În urma unui tratament cu tioli celulele de *Kluyveromyces fragilis* şi *Saccharomyces mellis* pot produce invertază extracelulară [Kidby & Dawies, 1970].

Invertaza extracelulară (EC 3.2.1.16) se mai poate obţine utilizând un fung producător de esterază monopalmitată, şi anume *Pullularia pullulans*.

19.3. BIOCINETICA OBŢINERII INVERTAZEI ÎN CULTURI SUBMERSE CU *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

19.3.1. Întreţinerea şi conservarea tulpinilor

Tulpinile comerciale de *Saccharomyces sp.* pot fi achiziţionate sub mai multe forme: drojdie proaspătă compresată şi drojdie uscată.

Drojdia proaspătă este caracterizată de un grad ridicat de umiditate (70%). Este perisabilă şi poate fi păstrată prin refrigerare pentru aproximativ 8 săptămâni.

Drojdia uscată activa presupune încă un pas în procesul de obţinere, comparat cu cea proaspătă, şi anume uscarea cu aer cald. Umiditatea finală va fi de numai 8%, tulpina fiind într-o stare semiactivă, putând fi păstrată o perioadă îndelungată, de până la un an.

19.3.2. Prepararea inoculului

Inoculul este o cultură de laborator care presupune foarte mare atenţie la preparare pentru evitarea unor eventuale contaminări. Tulpina folosită la prepararea inoculului trebuie sa fie pură, fiecare transfer pe medii de cultură fiind realizat în condiţii absolut sterile.

Inoculul de microorganisme se obţine pornindu-se de la o tulpină aflată în stare inactivă, sub diferite forme (proaspătă, în cultură liofilizată sau pe mediu solid înclinat).

În cazul culturii liofilizate, aceasta trebuie rehidratată şi repicată pe mediu solid înclinat (de obicei mediu glucoză/extract de drojdii/peptonă). Rehidratarea este foarte importantă deoarece efectuată incorect poate conduce la distrugerea microorganismelor în totalitate.

Din cultura aflată pe mediu înclinat (după 12–36 ore de cultivare) se realizează un ***preinocul*** într-un mediu lichid sub agitare continuă (de obicei se utilizează agitatoarele rotative). În acest preinocul se dezvoltă o cantitate mare de microorganisme ce se vor trece într-un vas de fermentare mai mare (300–500 l), iar de aici într-un germinator (fermentator de 3000–5000 l) ce va servi pentru inocularea mai multor fermentatoare (bioreactoare).

Drojdiile pot fi cultivate cu uşurinţă în condiţii de aerobioza (prin agitare) pentru obţinerea de biomasă în mediu YPG care conţine la 1000 ml apă distilată: 10 g peptonă,10 g extract de drojdii, 20 g glucoză. Condiţiile optime de cultivare sunt: *p*H optim = 7, temperatura 30°C timp de 48 de ore.

19.3.3. Faza de bioproces

Pregătirea cultivării. Cultivarea drojdiilor presupune existenţa unei surse de carbon, în principal glucoză. Industrial se foloseşte mai ales melasa, care trebuie iniţial limpezită şi sterilizată. Apoi va fi diluată cu apă, se ajustează aciditatea, încălzită până aproape de fierbere şi filtrată. Aportul de azot se realizează prin fosfat de amoniu şi se asigură sărurile minerale esenţiale, potasiu şi magneziu.

Cultivarea propriu-zisă. Cultivarea se realizează în vase de volum mare, care nu necesită sterilizare, ci doar curăţare cu abur fierbinte. Drojdia va fi hrănită cu melasa pregătită în prealabil şi cu mari cantităţi de aer (se evită fermentaţia alcoolică), aciditatea fiind mereu controlată şi ajustată la *p*H = 4,5–5,5. Se preferă cultivarea la temperatură mai ridicată (40°C) care favorizează apariţia invertazei.

Concentrarea drojdiilor. Concentrarea (recoltarea celulelor de drojdii) se efectuează prin trecerea lichidului fermentat prin pompe centrifugale, numite şi separatoare. După centrifugare se realizează una sau două spălări, urmând să se colecteze *crema* de drojdii ce va fi prelucrată ulterior.

19.4. EXTRACŢIA ŞI IZOLAREA INVERTAZEI DIN BIOMASA DE DROJDII

Invertaza a fost izolată pentru prima oară de către Berthelor în 1860 [Kulp, 1975]. De atunci şi până în prezent enzima a fost foarte studiată şi purificată din diferite surse şi prin diferite metode. Numai invertaza extrasă din drojdii a avut însă importanţă industrială.

Invertaza produsă de specia *Saccharomyces cerevisiae* este, în general, de natură intracelulară, prin urmare este necesară distrugerea membranei celulare în vederea extracţiei enzimei. Un extract proaspăt rezultat în urma autolizei drojdiei poate conduce la activitate enzimatică satisfăcătoare.

Iniţial, autoliza drojdiilor se realiza în prezenţa unor solvenţi ca, toluen, benzen, xilen, acetat de etil, urmat de o degradare enzimatică la *p*H = 7,0 în prezenţa unei enzime proteolitice (papaina). Invertaza eliberată în soluţie poate fi precipitată cu alcool sau cu un acid diluat (acetic, oxalic). Tehnologiile mai noi utilizează bicarbonat de sodiu pentru izolarea enzimei, după următoarele etape: 10 g de drojdie se adaugă peste 30 ml 0,1 M soluţie bicarbonat de sodiu; incubare la 40°C timp de 24 ore; centrifugare cu păstrarea supernatantului ce conţine enzima presupusă. Această soluţie enzimatică poate fi păstrată pentru câteva luni în frigider. Va fi diluată 1: 1000 chiar înainte de utilizare.

19.5. PURIFICAREA PREPARATELOR ENZIMATICE CU ACTIVITATE INVERTAZICĂ

După autoliza celulelor levuriene, autolizatul se limpezeşte prin ajustarea *p*H-ului la 4,7, urmat de filtrarea printr-un strat de sulfat de calciu şi adsorbţia pe un suport de cărbune.

Preparatele obţinute prin extracţia cu solvenţi se purifică utilizând bentonită sau hidroxid de aluminiu.

19.6. CONDIŢIONAREA PREPARATELOR CU ACTIVITATE INVERTAZICĂ

La ora actuală se utilizează tot mai des concentratele de invertază. *Crema* de celule obţinută prin tratamente mecanice poate fi uscată prin atomizare, rezultând o pudră ce poate doza 40 000 unităţi Sumner. Aceste produse sunt suficiente pentru majoritatea aplicaţiilor din industria alimentară.

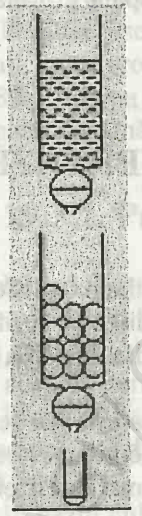


Fig. 19.2. Obţinerea bilelor de invertază imobilizată în alginat de calciu.

În cazul adsorbţiei pe cărbune, în prezent se utilizează preparatele tip Brimac™, în care amestecul invertază–cărbune este stabilizat prin *cross-linking*, având o durată de utilizare de 90 zile (*p*H = 5,5, 50°C).

Invertaza a fost printre primele enzime utilizate sub formă imobilizată. De obicei, invertaza obţinută cu ajutorul speciei *Saccharomyces cerevisiae* este imobilizată în alginat de calciu prin metoda imobilizării pe gel (fig. 19.2). În laborator, imobilizarea se reduce la următoare etape: hidratarea a 2 g alginat de sodium în 90 ml apă distilată caldă; amestecarea alginatului cu 10 ml soluţie invertază 1%; în 50 ml soluţie 0,1 M clorură de calciu se adaugă cu picătura 5 ml amestec alginat/invertază pentru a se forma perlele imobilizate; se lasă 5–10 minute în soluţie, apoi se scot şi se spală.

Trebuie precizat că invertaza obţinută din drojdii se află sub influenţa fenomenului de represie de catabolit, fiind inhibată la o concentraţie în zaharoză mai mare de 20%.

19.7. FLUXUL TEHNOLOGIC DE OBȚINERE A INVERTAZEI DIN TULPINI DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Diagrama fluxului tehnologic de obținere a invertazei din tulpini de *Saccharomyces sp.* este prezentată în figura 19.3.

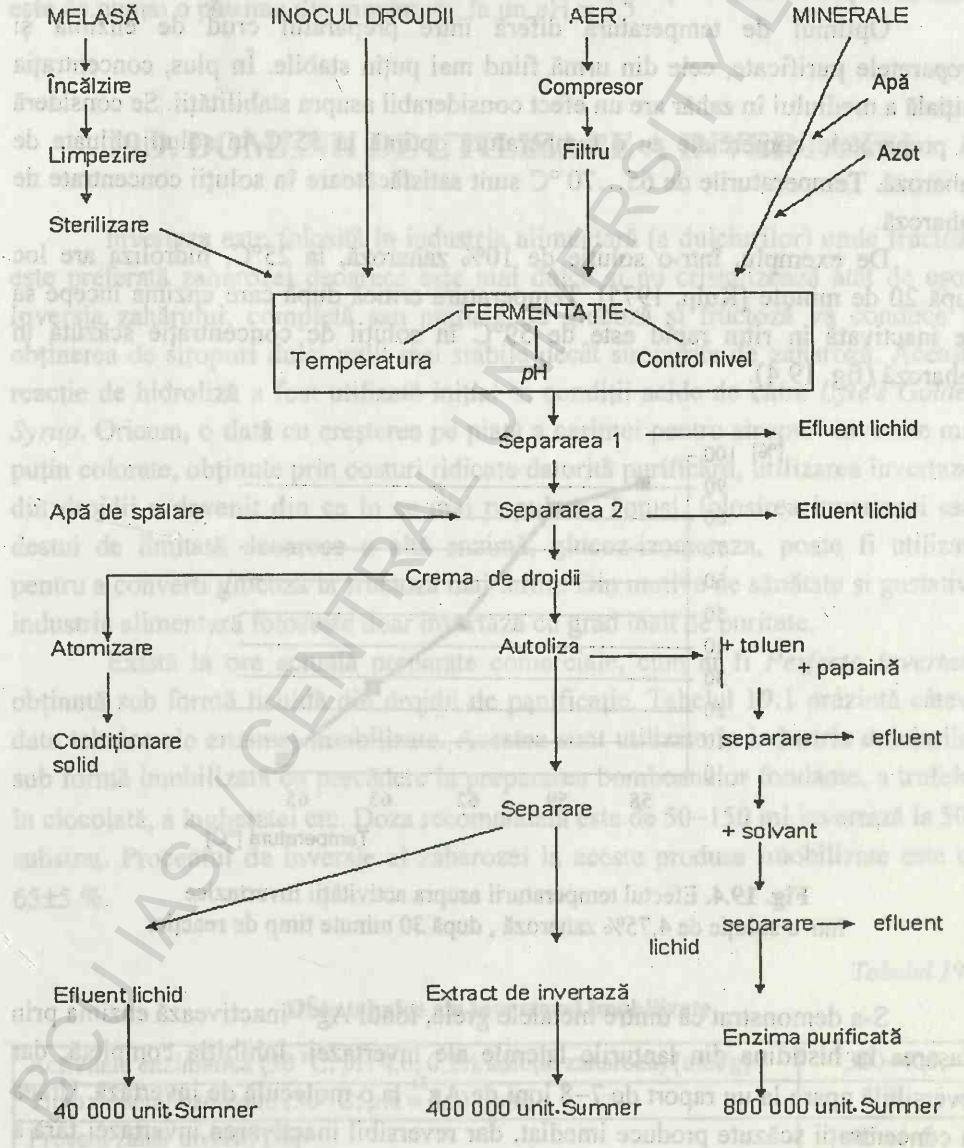


Fig. 19.3. Diagrama fluxului tehnologic de obținere a invertazei din culturi de *Saccharomyces sp.*

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

19.8. CARACTERISTICILE FIZICO-CHIMICE ŞI BIOCHIMICE ALE PREPARATELOR PURIFICATE DE INVERTAZĂ

În contrast cu multe alte enzime, invertaza are activitate relativă ridicată într-un interval mare de *p*H = (3,5–5,5), având optimul la *p*H = 4,5. În acest interval de *p*H enzima are şi cea mai ridicată stabilitate.

Optimul de temperatură diferă între preparatul crud de enzimă şi preparatele purificate, cele din urmă fiind mai puţin stabile. În plus, concentraţia iniţială a mediului în zahăr are un efect considerabil asupra stabilităţii. Se consideră că preparatele comerciale au o temperatură optimă la 55°C în soluţii diluate de zaharoză. Temperaturile de 65...70 °C sunt satisfăcătoare în soluţii concentrate de zaharoză.

De exemplu, într-o soluţie de 10% zaharoză, la 25°C, hidroliza are loc după 20 de minute [Kulp, 1975]. Temperatura critică după care enzima începe sa fie inactivată în ritm rapid este de 59°C în soluţii de concentraţie scăzută în zaharoză (fig. 19.4).

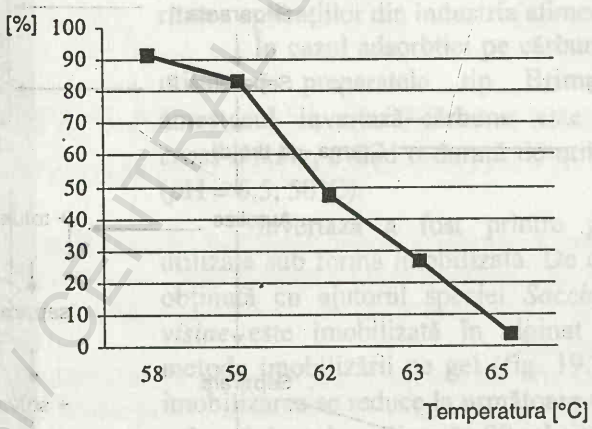


Fig. 19.4. Efectul temperaturii asupra activităţii invertazice într-o soluţie de 4,75% zaharoză , după 30 minute timp de reacţie.

S-a demonstrat că dintre metalele grele, ionul Ag^{2+} inactivează enzima prin ataşarea la histidina din lanţurile laterale ale invertazei. Inhibiţia completă, dar reversibilă apare la un raport de 7–8 ioni de Ag^{2+} la o moleculă de invertază. Ureea în concentraţii scăzute produce imediat, dar reversibil inactivarea invertazei fără a altera proprietăţile fizice ale enzimei. La concentraţii ridicate (8 M şi *p*H = 5,0)

apare inactivarea ireversibilă o dată cu modificarea structurii secundare şi terţiare [Kulp, 1975]. De asemenea, sulfatul de cupru şi anilina s-au dovedit a avea un efect inhibitor asupra activităţii enzimatice a invertazei.

Efectul concentraţiei substratului asupra activităţii invertazice este foarte important, deoarece zaharoza este foarte solubilă, iar în practică se doreşte cel mai adesea hidroliza unor soluţii concentrate de zahăr. Rata optimă de conversie s-a obţinut la o concentraţie de 5–8% în zaharoză; la 70% zaharoză rata de inversie este de numai o pătrime din maximum, la un *p*H = 4,5.

19.9. DOMENII DE UTILIZARE A INVERTAZEI

Invertaza este folosită în industria alimentară (a dulciurilor) unde fructoza este preferată zaharozei deoarece este mai dulce şi nu cristalizează atât de uşor. Inversia zahărului, completă sau parţială, la glucoză şi fructoză va conduce la obţinerea de siropuri dulci mult mai stabile decât siropurile de zaharoză. Această reacţie de hidroliză a fost utilizată iniţial în condiţii acide de către *Lyle's Golden Syrup*. Oricum, o dată cu creşterea pe piaţă a cerinţei pentru siropuri invertite mai puţin colorate, obţinute prin costuri ridicate datorită purificării, utilizarea invertazei din drojdii a devenit din ce în ce mai populară. Totuşi, folosirea invertazei este destul de limitată deoarece o altă enzimă, glucoz-izomeraza, poate fi utilizată pentru a converti glucoza la fructoză mai ieftin. Din motive de sănătate şi gustative industria alimentară foloseşte doar invertază cu grad înalt de puritate.

Există la ora actuală preparate comerciale, cum ar fi *Perfecto Invertase* obţinută sub formă lichidă din drojdii de panificaţie. Tabelul 19.1 prezintă câteva date tehnice ale enzimei imobilizate. Acestea sunt utilizate în industria dulciurilor sub formă imobilizată cu precădere la prepararea bomboanelor fondante, a trufelor în ciocolată, a îngheţatei etc. Doza recomandată este de 50–150 ml invertază la 50 l substrat. Procentul de inversie al zaharozei la aceste produse imobilizate este de 65±5 %.

Tabelul 19.1

Date tehnice ale invertazei imobilizate

Activitate enzimatică (30 °C; *p*H 4,6; 0,2% soluţie zaharoză) [unit/g]	300–400
Timp de semiinactivare (50° C; *p*H = 4,6) [luni]	6
Procent zahăr invertit [%]	65 +/–5

Alte domenii posibile de utilizare:

– industria laptelui: hidroliza lactozei la glucoză şi galactoză; fabricarea îngheţatei;

– industria zahărului: conversia zaharozei la glucoză şi fructoză;

– producerea de băuturi nealcoolice;

– fabricarea mierii artificiale.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Partea a IV-a

IMPLICAȚII ALE BIOTEHNOLOGIEI ÎN ALTE DOMENII

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- **TOXICOLOGIE BIOTEHNOLOGICĂ**
- **DEGRADAREA MICROBIANĂ A MATERIALELOR**
- **NOȚIUNI DE ECOLOGIE**
- **COMPUȘI FITOCHIMICI INDUSTRIALI: ABORDĂRI BIOTEHNOLOGICE**

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

20. TOXICOLOGIE BIOTEHNOLOGICĂ

Toxicologia este o disciplină complexă, multilaterală, care face apel la diferite alte discipline înrudite precum: medicina, genetica, chimia, biologia, biochimia, farmacia, botanica, zoologia etc. Toxicologia ca ştiinţă se ocupă cu studiul substanţelor toxice de orice natură (minerală, vegetală, microbiană, animală), al intoxicaţiilor, luând în consideraţie cauzele, simptomele ce apar, mecanismele de acţiune ale compuşilor toxici în organisme (efectele metabolice, morfo-patologice), precum şi mijloacele de prevenire şi combatere ale efectelor toxice. Verigile principale ale proceselor toxice implică substanţele toxice, organismele afectate şi mediul înconjurător.

Primele otrăvuri cunoscute au fost de origine vegetală. Bazele toxicologiei ştiinţifice au fost puse de Orfila Mathieu Joseph Bonaventure, medic şi chimist francez, care a publicat în 1814 un tratat de *Toxicologie generală*. La noi în ţară, în Principatele Române, amintim pe C. Hepites din Brăila, farmacist şi medic. În Moldova secolului al XIX-lea au activat farmaciştii Torenberg, Avramfi şi Locman. Din 1890, toxicologia aplicată este reprezentată la noi de Mina Minovici, farmacist şi medic, care a întemeiat Institutul de Medicină Judiciară.

Datorită industrializării şi chimizării excesive a majorităţii ramurilor de activitate a omului, mediul toxic este considerat în prezent nelimitat. Se înregistrează modificări în rândul bolilor de tip toxic, manifestându-se în special, aşa-zisele „boli ale civilizaţiei". Dacă în vechime erau frecvente intoxicaţiile cu As, Hg şi otrăvuri extrase din plante sau animale, astăzi intoxicaţiile au cauze multiple. Încă acum două secole, profesorul Truhaut spunea: *„toxicologia contribuie să facă munca inofensivă pentru viaţă şi să păstreze viaţa pentru muncă"*, sintagmă pe care o considerăm extrem de actuală.

Numărul substanţelor ce devin toxice în agricultură, industrie, alimentaţie etc. (erbicide, fungicide, insecticide, raticide, conservante, deşeuri radioactive sau chimice, în atmosferă, apă, sol etc.) a crescut îngrijorător.

Sfera largă de cercetare a toxicologiei a impus delimitarea acestei științe în:

– ***Toxicologie generală***, care se ocupă cu studiul acțiunilor generale ale toxicelor;

– ***Toxicologie specială***, care se ocupă cu studiul acțiunilor specifice ale fiecărui toxic. Se poate vorbi despre toxicologie: industrială, terestră sau acvatică, legală, clinică, veterinară, profesională, inhalatorie, fitotoxicologie, pirotoxicologie etc.

În mod firesc ***biotehnologia***, precum și aplicațiile ei industriale, ca activitate de mare amploare în ultimele decenii, impun cercetări toxicologice legate de produsele finite obținute, de microorganismele utilizate și de eventualele deșeuri. În principal, biotehnologia dezvoltă ramuri nepoluante, existând chiar preocuparea pentru anihilarea pe cale biotehnologică a deșeurilor și poluării (se folosesc spre exemplu, alge marine care utilizează petele de petrol deversate în mare, ca sursă de carbon). În contextul arătat se poate vorbi de o ramură aparte a toxicologiei speciale, anume ***toxicologia biotehnologică***.

În general, biotehnologia (tradițională și modernă) este definită ca un sistem de concepte și metode ce utilizează microorganismele și substanțele produse de acestea (enzimele libere și fixate, spre exemplu). Federația Europeană de Biotehnologie (EFB) definește acest sistem complex de tehnici ca fiind *„o sfidare tehnică a viitorului, prin utilizarea integrată a biochimiei, microbiologiei și ingineriei în scopul obținerii unor aplicații industriale, cu ajutorul microorganismelor, culturilor de celule și a părților componente ale acestora"*.

Clasificarea biotehnologiilor în ***biotehnologii industriale*** (farmaceutice, depoluante, alimentare), ***biotehnologii agricole*** (vegetale, zootehnice) și ***biotehnologii medical-veterinare*** pune problema studiilor toxicologice în toate aceste subdomenii. În contextul amintit, toxicologia biotehnologică atinge o serie de aspecte precum:

a. ***producția metaboliților toxici*** ai microorganismelor (în speță micotoxinele și toxinele bacteriene) utilizate la procesele fermentative;

b. ***contaminarea produselor*** biotehnologice, a biomaselor, cu microorganisme toxigene și patogene (bacterii, fungi);

c. ***apariția unor substanțe toxice*** pe parcursul proceselor biotehnologice fermentative din diferite ramuri (industrie farmaceutică, alimentație etc.), altfel spus, toxicologia bioproceselor (obținerea antibioticelor, obținerea biomasei, obținerea sucurilor de fructe și legume etc.);

d. ***purificarea enzimelor*** utilizate în procesele biotehnologice (activitățile enzimatice parazite depreciază produsele finite și pot determina apariția unor compuși toxici);

e. ***efectele toxinelor naturale preexistente în materiile prime*** utilizate în biotehnologii (fitotoxine, glicozizi cianogenetici, grăsimi, alcaloizi, toxine animale) şi care pot să sufere fenomene de creştere ale potenţialului toxic pe parcursul proceselor biotehnologice;

f. ***aditivii produselor biotehnologice*** (coloranţi, antioxidanţi, emulsionanţi, conservanţi, aromatizanţi), în general substanţe organice de sinteză, alergogene, cu potenţial toxic;

g. ***defectele de tehnologie şi îndepărtarea substanţelor adăugate*** în etapele proceselor biotehnologice, cu rol de catalizatori (acizi, baze, ioni ale metalelor grele etc.), potenţial toxice şi care impurifică produsele finite;

h. ***efectele toxicelor*** (îngrăşăminte chimice, pesticide folosite ca erbicide, deparazitante, raticide, insecticide, deşeuri radioactive în ape, noxe toxice în aer, sol etc.) *remanente*, care se cumulează în materiile prime utilizate în biotehnologii;

i. ***ambalajele produselor finite*** rezultate din procesele biotehnologice (mai ales farmaceutice şi alimentare), care pot deprecia produsele prin eliberarea unor substanţe toxice (Pb, Sn etc.);

j. ***profilaxia fenomenelor toxice***, prin îmbunătăţirea tehnologiilor, modificarea unor bioprocese, sporirea gradului de purificare al enzimelor, al produselor finite etc.;

k. ***detoxifierea substanţelor toxice*** prin intervenţia sistemelor enzimatice, detoxifiante, proprii organismelor contaminate sau intoxicate şi remediile antitoxice externe organismelor (antidoturile), utilizabile în cazul intoxicaţiilor declanşate.

Biotehnologia poate rezolva probleme legate de o alimentaţie bogat proteică, de furajare a animalelor, probleme ale sănătăţii prin medicamente sintetizate de microbi etc., dar produsele biotehnologice farmaceutice şi alimentare necesită teste toxicologice înainte de a fi comercializate. Unele produse biotehnologice utilizate ca aditivi alimentari, furajeri, sau ca medicamente (de exemplu: îndulcitorii, biomasele, antibioticele etc.) necesită studii aprofundate pentru omologare, prin care sunt testate efectele pe termen lung asupra organismelor. Se acordă o atenţie deosebită omologărilor pentru a evita dezastrul înregistrat cu medicamentul Thalidomida (administrat pentru a preveni greaţa de dimineaţă a femeilor însărcinate, dar care a provocat mutaţii genetice la făt) în anii '70 ai secolului al XX-lea.

De asemenea, au fost înregistrate unele insuccese legate de folosirea enzimelor microbiene (lipaze, proteaze) în compoziţia detergenţilor biodegradabili. S-a observat că aceştia au provocat fenomene alergice cutanate. Interesul pentru aceste tipuri de detergenţi a scăzut după anii '90.

În scopul evitării efectelor toxice, noile produse biotehnologice sunt testate vreme de mai mulţi ani pe animale rozătoare şi nerozătoare, urmărindu-se efectele

fiziologice şi eventualele stări patologice care se instalează. Astfel, omologarea aspartamului (îndulcitor) a durat aproximativ 10 ani.

Atragem atenţia asupra conceptului de ***toxicologie biotehnologică*** introdus de autoare, ce răspunde necesităţii stringente de studiere a aspectelor toxicologice ale aplicaţiilor biotehnologice în industrie, agricultură, depoluare etc. Aspectele tehnologice, medicale şi comerciale, interesează în cel mai înalt grad pe producătorii, dar şi pe consumatorii produselor biotehnologice, deoarece vizează noile tendinţe de orientare ecologică din chimia alimentară, furajeră şi a biopreparatelor farmaceutice.

Fără a fi exhaustivi, vom aborda câteva aspecte ale problematicii trecute în revistă mai sus, invitând pe cei interesaţi de domeniu să reflecteze asupra conceptului de ***toxicologie biotehnologică***, deoarece sugerează o serie de cercetări şi aplicaţii practice de viitor.

20.1. METABOLIŢI TOXICI AI MICROORGANISMELOR UTILIZATE ÎN BIOTEHNOLOGII SAU AI FLOREI DE CONTAMINARE

Bacteriile, ***drojdiile*** şi ***mucegaiurile*** (fungii) au un rol deosebit de important în biotehnologii, prin capacităţile lor speciale (echipamente enzimatice) de a fermenta substraturi variate, organice şi anorganice, fermentaţii din care rezultă o gamă largă de metaboliţi primari şi secundari.

Diferenţierea dintre *metaboliţii primari* şi *secundari* nu este chiar atât de uşor de stabilit, cu toate că se admite, în mod general, că metaboliţii primari (esenţiali pentru creşterea microorganismului) se formează în faza de creştere logaritmică a microorganismelor, pe când metaboliţii secundari apar la sfârşitul acestei perioade şi în perioada staţionară (de obicei prin lanţuri lungi de reacţii biochimice, precum sinteza antibioticelor).

Biosinteza metaboliţilor secundari este practic dependentă de condiţiile de multiplicare ale microorganismelor, precum: compoziţia mediului de cultură, concentraţia nutrienţilor din mediu, dimensiunea inoculului, temperatura, *p*H-ul etc. Modificările mediului de viaţă duc la apariţia fenomenului de represie a sintezei unor metaboliţi, fiind eventual favorizată sinteza unor toxine (aproape toate sunt metaboliţi secundari).

Marea majoritate a microbilor produce toxine. Se consideră că doar cinci microorganisme pot fi considerate sigure, din punct de vedere toxicologic. Acestea

sunt: o bacterie (*Bacillus subtilis*), două drojdii (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*) şi două specii de mucegaiuri (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*).

a. ***Bacteriile*** pot fi patogene şi/sau toxigene. Toxinele bacteriene se clasifică în endo- şi exotoxine. Exotoxinele au mase moleculare mici şi pot părăsi bacteria prin peretele de peptidoglican (la bacteriile Gram-pozitive) sau prin membrana externă (la bacteriile Gram-negative), fără probleme. Endotoxinele sunt lipoglicoproteine legate intim de membrana externă a bacteriilor Gram-negative, iar eliberarea lor implică distrugerea microbului.

De multe ori, intoxicaţiile apar prin utilizarea unor produse biotehnologice în care bacteria nici nu poate fi depistată, dar toxina continuă să existe. De altfel, toxinele sunt eliberate ca pretoxine, care nu prezintă toxicitate. O dată cu eliberarea în mediu, apar reorganizări moleculare, clivări, pierderi de aminoacizi etc., evenimente care declanşează manifestarea toxicităţii.

Marea majoritate a toxinelor bacteriene prezintă proprietăţi antigenice, respectiv stimulează producerea anticorpilor în organismele în care au pătruns. S-a constatat că uneori, exotoxinele îşi pierd spontan toxicitatea, dar îşi conservă antigenitatea. O astfel de toxină transformată a fost denumită *toxoid* (sau anatoxină). Transformarea toxinelor în toxoizi este stimulată de formaldehidă, acidul azotos, acidul ascorbic, hexametilentetraamina etc.

Cu toate ipotezele enunţate asupra rolului toxinelor pentru microorganismele producătoare, semnificaţia lor biologică rămâne încă necunoscută. Aceeaşi nelămurire planează şi asupra existenţei receptorilor celulari de toxine (*suicide receptors*), aflaţi pe membrana celulară a altor organisme. Se crede că aceşti receptori sunt practic receptori hormonali, pentru hormoni cu structuri glicoproteice asemănătoare toxinelor bacteriene.

În biotehnologii se utilizează atât bacterii aerobe cât şi anaerobe. Gradul de aerare influenţează mult posibilitatea dezvoltării altor specii de bacterii decât cele dorite, provocând contaminarea mediului. Pătrunderea aerului într-un mediu anaerob poate favoriza dezvoltarea unor genuri de bacterii nedorite la un anume proces, precum *Pseudomonas*, *Xantomonas*. Specii din genurile amintite pot consuma şi azot în loc de oxigen.

Bacteriile din genul *Bacillus* utilizate pe scară largă în industrie (industria alimentară, farmaceutică, a detergenţilor etc.) sunt mari producătoare de enzime şi antibiotice. O serie de specii precum: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus sphaericus* produc toxine proteice (cristale proteice), utilizate cu succes drept insecticide. Acest tip de toxine nu au formulele elucidate în întregime, dar distrug atât larvele, cât şi insectele adulte.

În biotehnologia cărnii, inocuitatea microbiologică este deosebit de importantă. Dacă bacteriile lactice din culturile starter nu acidifiază suficient

produsul respectiv, *p*H-ul crește favorizând dezvoltarea *Clostridium botulinum*, a cărui toxină (neurotoxina, utilizabilă ca armă biologică) este foarte puternică (1 mg de toxină botulinică conține 20 000 000 de doze letale pentru cobai, omul fiind și mai sensibil), afectând grav sistemul digestiv, nervos și muscular. *Clostridium perfrigens* sintetizează la rându-i α-toxine. *Clostridium welchii* sintetizează o gamă largă de toxine, unele letale (β-, δ-, γ-toxina), altele cu activitate fosfolipazică (α-toxina), colagenazică (κ-toxina), sau hialuronidazică (μ-toxina).

De asemenea, multiplicarea *Salmonella* constituie factor de risc, datorită biosintezei enterotoxinei, cu urmări grave asupra sistemului digestiv și homeostaziei. Alte bacterii contaminante produc toxine deosebit de puternice, de origine proteică. Spre exemplu, *Escherichia coli* formează enterotoxina termolabilă, *Shigella sp.* produce toxina Shiga (enterotoxină), *Pseudomonas aeruginosa* este responsabilă de apariția toxinei A, *Streptococcus pyrogenes* sintetizează toxine pirogene (toxina Dick, streptokinaza, hemoragina).

O serie dintre exotoxinele bacteriene (de natură proteică) au proprietăți citolitice, fiind sintetizate în faza de multiplicare microbiană logaritmică și în faza staționară timpurie. Acestea au greutăți moleculare mari și poartă numele generic de hemolizine (*Bacillus cereus* sintetizează cereolizina, *Staphylococcus aureus* sintetizează α-toxina, α-lizina β-toxina, δ-toxina, *Streptococcus sp.* sintetizează streptolizina, *Bacillus thuringiensis* sintetizează turingiolizina etc.), datorită capacității de liză asupra hematiilor.

b. În privința ***drojdiilor*** utilizate în biotehnologii, se constată toxicitatea unor reprezentanți, prin potențialul patogen pe care îl pot manifesta în anumite circumstanțe. Au fost semnalate cazuri de infecții provocate de *Kluyveromyces sp.* la bolnavi cu capacități imunologice scăzute. Alte specii, precum *Candida utilis* (utilizată pe scară largă ca aditiv furajer și producție de biomasă) pot fi implicate în infecții mamare (mastite), diferite abcese, alături de stafilococi. Menționăm că toxicitatea și patogenitatea acestor drojdii este în general redusă, dar se manifestă efecte sinergice în prezența altor microbi.

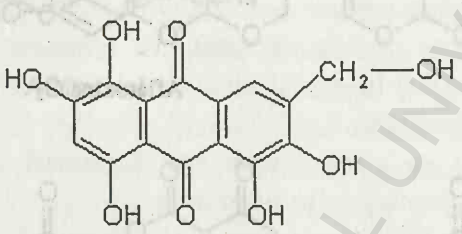
c. ***Mucegaiurile*** utilizate în biotehnologii (fungii), multe dintre ele toxigene, necesită o atenție specială. În afara faptului că toxinele lor acționează puternic, chiar în cantități mici, se pune problema sinergismului acestor toxine o dată ajunse în organismele superioare. Nu va conta prea mult câte p.p.m. dintr-o toxină s-au găsit într-un produs, ci câte tipuri de toxine ce-și potențează efectele (chiar fiind în cantități mai mici) se află în acesta. Toxinele fungilor se cunosc sub numele de *micotoxine* și sunt metaboliți secundari ai acestor microbi. Afecțiunile declanșate de micotoxine se numesc *micotoxicoze.*

Mucegaiurile din genurile *Aspergillus, Penicillium, Cephalosporium, Mucor, Rhizopus, Trichoderma* etc. sunt larg utilizate în biotehnologia alimentară

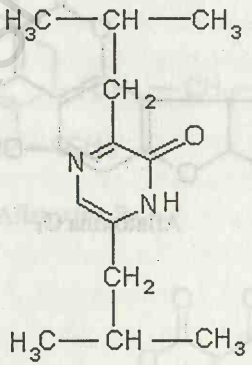
(fermentarea şi maturarea brânzeturilor, salamurilor etc.) şi în biotehnologia farmaceutică, multe fiind producătoare de antibiotice.

Speciile de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. zonatus*, *A. clavatus*, *A. sojae*, *A. toxicarius*, *A. nidulans* etc.) produc micotoxine puternice cunoscute sub denumirea de aflatoxine. Alţi metaboliţi cu acţiune antibiotică elaboraţi de *Aspergillus flavus* sunt *asperthecina*, *flavacolul* şi *acidul aspergilic*.

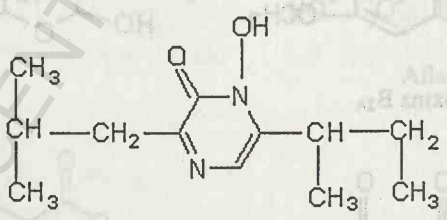
Aceşti compuşi îşi manifestă acţiunea toxică asupra altor microorganisme. În general fungii galbeni-verzui, cum a fost denumit genul *Aspergillus* sunt nelipsiţi de pe toate cerealele şi furajele, datorită abilităţii lor de a invada substraturile solide.



Asperthecina

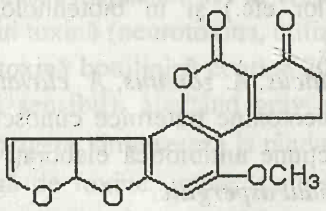


Flavacol

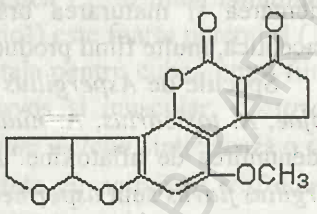


Acid aspergilic

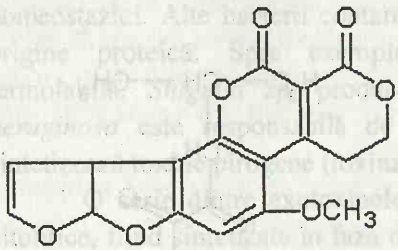
Aflatoxinele sunt toxigene, carcinogene (cele mai puternice carcinogene naturale cunoscute), mutagene şi teratogene. Ele au fost descoperite în 1960, moment ce a marcat aşa-numita „revoluţie a micotoxinelor". Aflatoxinele, compuşi cu structură cumarinică, au fost notate iniţial în ordinea descrescătoare a activităţii biologice şi toxicităţii, după cum urmează: aflatoxina B_1, aflatoxinele G_1, G_2, aflatoxina B_2 (produse în speţă de *Aspergillus parasiticus*, extrem de toxigen, urmat de *Aspergillus flavus*). Ele sunt grupate în trei categorii: aflatoxine majore, aflatoxine monohidroxilate şi aflatoxine dihidroxilate.



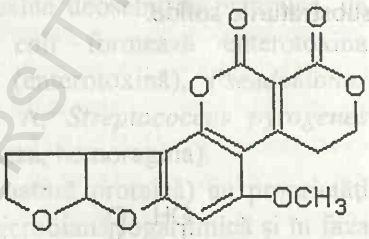
Aflatoxina B_1



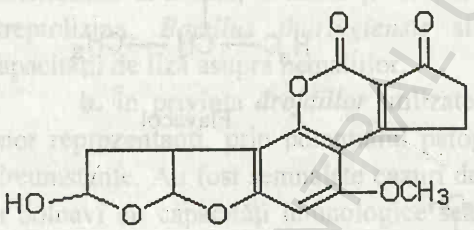
Aflatoxina B_2



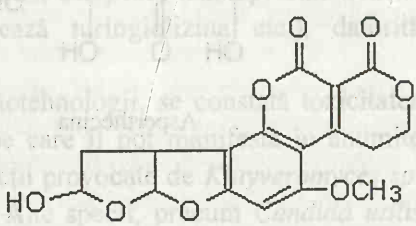
Aflatoxina G_1



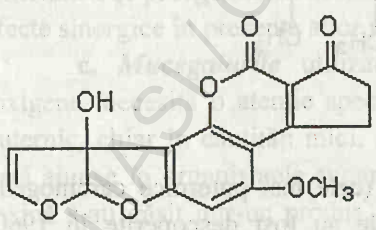
Aflatoxina G_2



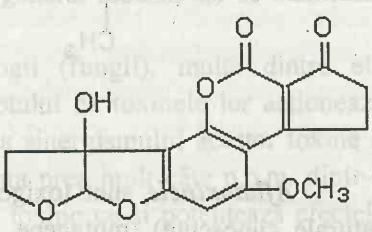
Aflatoxina B_{2A}



Aflatoxina G_{2A}



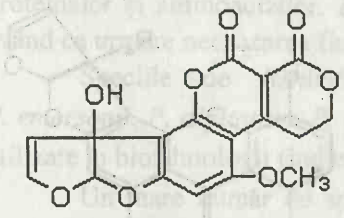
Aflatoxina M_1



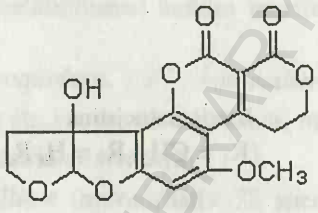
Aflatoxina M_2

Cercetările ulterioare au identificat alți 13 metaboliți toxici precum: *parasiticolul*, *aflatoxicolul*, *aflatoxinele* GM_1, GM_2, *aflatoxina* P_1, *aflatoxina* M_{2A} și altele.

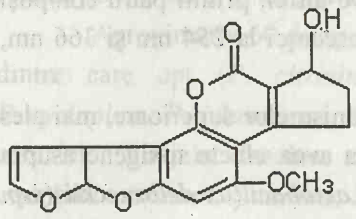
BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



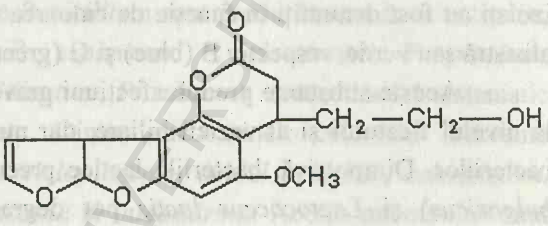
Aflatoxina GM_1



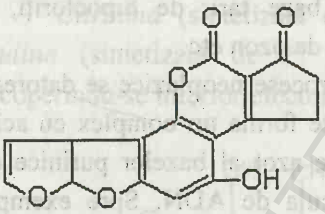
Aflatoxina GM_2



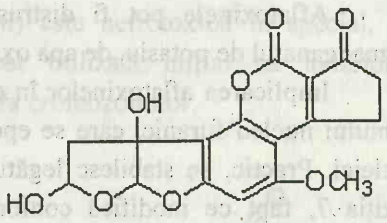
Aflatoxicol



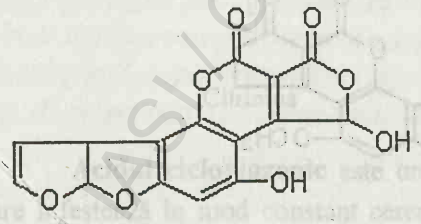
Aflatoxina B_3



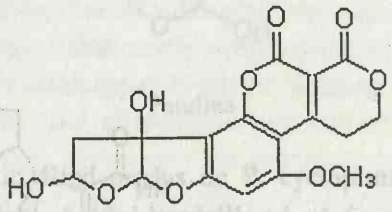
Aflatoxina P_1



Aflatoxina M_{2A}



Aflatoxina Q_1

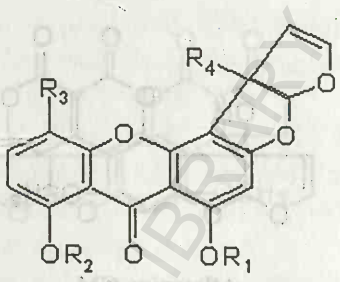


Aflatoxina GM_{2A}

Un alt metabolit secundar toxic este *sterigmatocistina*, carcinogenă, sintetizată în principal, de *Aspergillus versicolor* şi *Aspergillus nidulans*:

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sterigmatocistina
($R_1 = CH_3$, $R_2 = H$, $R_3 = H$, $R_4 = H$)

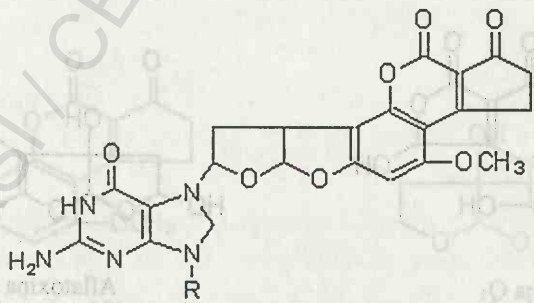


Aflatoxinele prezintă fluorescență în UV. De altfel, primii patru compuși izolați au fost denumiți în funcție de culoarea fluorescenței la 254 nm și 366 nm, albastră sau verde, respectiv B (blue) și G (green).

Aceste substanțe produc afecțiuni grave organismelor superioare, mai ales la nivelul ficatului și al vezicii biliare, dar nu par a avea efecte toxigene asupra bacteriilor. Dimpotrivă, bacteriile lactice precum: *Lactobacillus delbrueckii* (*ssp. bulgaricus*) și *Lactococcus lactis* pot degrada aflatoxina B_1. Detoxifierea și degradarea acestor toxine poate avea loc în special în stomacul ierbivorelor (în special ovine), sub influența florei microbiene.

Aflatoxinele pot fi distruse de acizi și baze tari, de hipocloriți, de permanganatul de potasiu, de apa oxigenată, de clor, de ozon etc.

Implicarea aflatoxinelor în etiologia unor procese neoplazice se datorează primului nucleu furanic, care se epoxidează și poate forma un complex cu acizii nucleici. Practic, se stabilesc legături cu atomul de azot al bazelor purinice din poziția 7, fapt ce modifică conformațional molecula de ADN. Spre exemplu, aductul (7-Guanozil-aflatoxina B_1) format cu guanina are următoarea formulă chimică:



7-Guanozil-aflatoxina B_1

Efectul hepatocarcinogenic se datorează formării în hepatocit a semiacetalului de aflatoxină, care leagă nediscriminat grupările $-NH_2$ ale

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

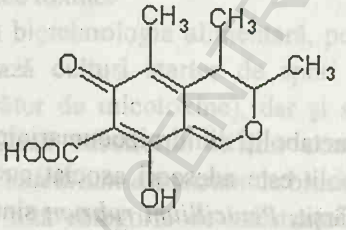
proteinelor şi aminoacizilor. Este perturbat astfel metabolismul celulei hepatice, având ca urmare necrozarea ficatului.

Speciile de *Penicillium* (*Penicillium roqueforti*, *P. camembertii*, *P. emersonii*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. italicum* etc.) sunt, de asemenea, mult utilizate în biotehnologii (industria farmaceutică, industria alimentară).

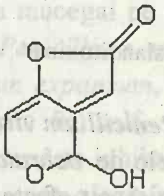
Un mare număr de specii din genul *Penicillium* (aproximativ 72 specii) produc în anumite condiţii, o gamă diversificată de metaboliţi secundari, precum: alcaloizi, terpene, steroli, β-lactame, derivaţi ai acizilor graşi, policetone etc. Astfel, *penicilina* şi *griseofulvina* sunt utilizate ca antibiotice.

Aproximativ 60 de specii de *Penicillium* sunt producătoare de micotoxine, dintre care opt (*P. citrininum*, *P. expansum*, *P. claviforme*, *P. patulum*, *P. cyclopium*, *P. islandicum*, *P. viridicatum*, *P. rubrum*), contaminează sistematic cerealele, furajele, fasolea, soia etc. Dintre micotoxinele cele mai frecvente amintim: *citrinina*, *patulina*, *acidul ciclopiazonic*, *acidul penicilic*, *ochratoxina*, *rubratoxina*, *ciclocloratina*, *islanditoxina* şi *luteoskirina*. Aceste micotoxine sunt nefro- şi hepatotoxice, dar afectează şi glanda tiroidă, musculatura, sistemul circulator, cordul, provocând tumori localizate.

Citrinina (sintetizată de *P. citrininum*) este nefrotoxică în special, iar *patulina* (sintetizată de *P. patulum*) a fost utilizată iniţial ca antibiotic, descoperindu-se ulterior efectul mitostatic asupra cromozomilor.



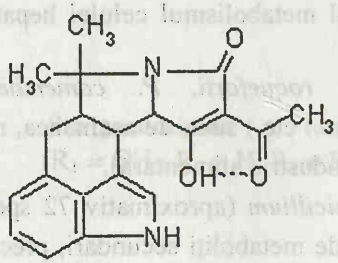
Citrinina



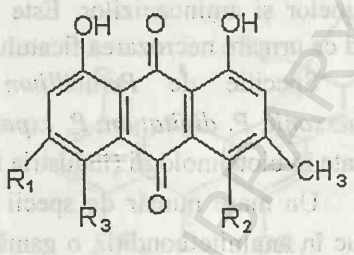
Patulina

Acidul ciclopiazonic este un nefrotoxic, fiind produs de **P. cyclopium**, care infestează în mod constant cerealele şi fânul. **Acidul penicilic** (două forme tautomere), alt metabolit al **P. cyclopium** provoacă tumori localizate la rinichi, ficat şi tiroidă.

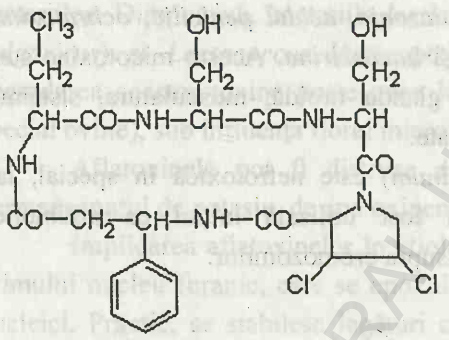
Islanditoxina şi *ciclocloratina* sunt hepatotoxice, fiind produse de *P. islandicum*. Acest fung sintetizează de asemenea, o serie de alte toxine antrachinonice precum: *skyrina*, *luteoskyrina* etc.



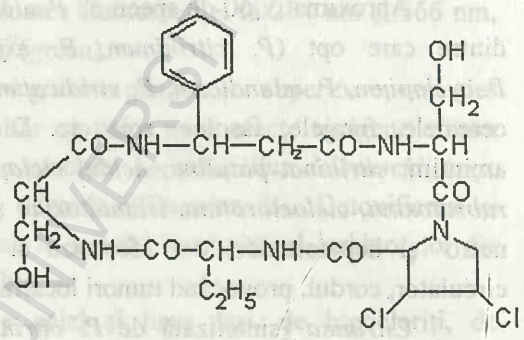
Acid ciclopiazonic



Skirina (R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = rest identic cu structura de bază)

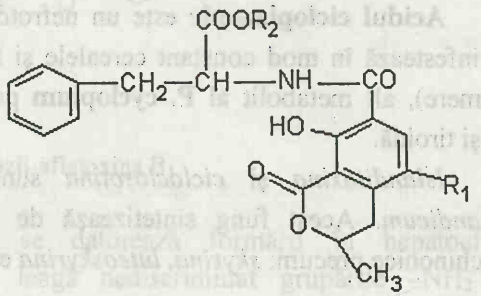


Islanditoxina



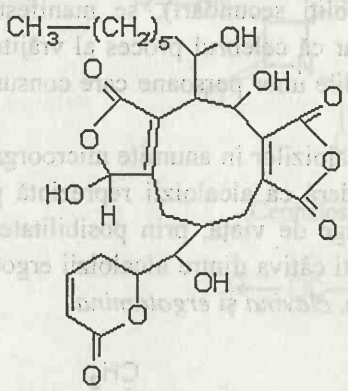
Ciclocloritina

Penicillium viridicatum produce metaboliți dihidroizocumarinici, cunoscuți sub numele de *ochratoxină* (acest metabolit este adeseori asociat cu *Aspergillus ochraceous*), cu efecte nefrotoxice. În sfârșit, *Penicillium rubrum* sintetizează un metabolit cu efect hepatotoxic, nefrotoxic și hemoragipar, numit *rubratoxină*. Rubratoxina se găsește în două forme, anume rubratoxina A și rubratoxina B.

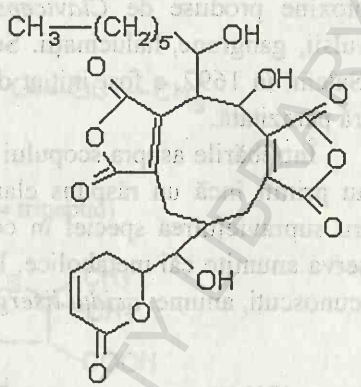


Formula de bază a ochratoxinelor

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Rubratoxina A



Rubratoxina B

Studiile asupra rubratoxinelor au indicat efectul sinergic al acestora cu aflatoxinele, a căror activitate o potențează (rubratoxina B sinergică cu aflatoxina B_1). Problema sinergismului micotoxinelor este extrem de delicată, deoarece în acest context, ele acționează în cantități extrem de mici. De multe ori, deși apar simptomele micotoxicozelor, toxinele ce au provocat fenomenele nu pot fi depistate nici măcar în urme.

S-a constatat că un titru ridicat de ioni de Ca^{2+} favorizează sporularea speciilor de *Penicillium*. Concomitent, sinteza metaboliților stopează, iar fungul nu mai produce toxine.

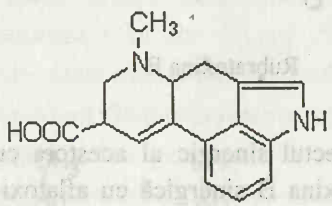
În biotehnologia alimentară, pentru salamurile cu mucegai pe membrane, se utilizează culturi starter de spori proveniți de la *Penicillium nalgiovensis* (neproducător de micotoxine), dar și spori de *Penicillium expansum*, toxigen în general. Dacă substratul utilizat conține proteine bogate în sulf, capacitatea fungului *Penicillium expansum* de biosinteză a micotoxinelor este inhibată.

O altă categorie de substanțe cu potențial toxic sunt ***alcaloizii ergotici***. Caracteristic pentru acești alcaloizi este faptul că au în structură nuclee indolice. Ei pot fi utilizați în doze corespunzătoare pentru reducerea hemoragiilor postpartum, precum și pentru calmarea migrenelor, cefaleelor, nevralgiilor de trigemen, prin faptul că inhibă sistemul nervos simpatic. Pot provoca contractura musculaturii netede.

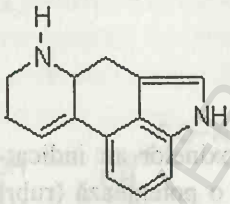
Alcaloizii ergotici sunt produși de o gamă largă de fungi, dintre care se remarcă specii de *Claviceps* (*C. purpurea*, *C. paspali* etc.), specii de *Aspergillus*, de *Penicillium* și de *Rhizopus*. *Claviceps* (aproximativ 36 specii) parazitează aproximativ 600 specii de graminee, bine cunoscute fiind intoxicațiile provocate de infestarea lanurilor de secară cu acest microb. Simptomele intoxicației, numită ergotism (intoxicația nu se datorează numai alcaloizilor ergotici, ci și unor

micotoxine produse de *Claviceps* ca metaboliți secundari), se manifestă prin convulsii, gangrene, halucinații. Se crede chiar că celebrul proces al vrăjitoarelor din Salem, în 1692, a fost inițiat de halucinațiile unor persoane care consumaseră secară parazitată.

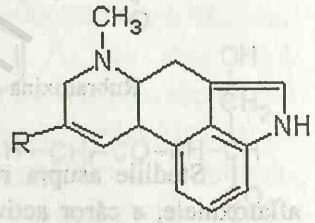
Întrebările asupra scopului sintezei alcaloizilor în anumite microorganisme nu au primit încă un răspuns clar. Se consideră că alcaloizii reprezintă pârghii pentru supraviețuirea speciei în condiții vitrege de viață, prin posibilitatea de a conserva anumite căi metabolice. Putem aminti câțiva dintre alcaloizii ergotici cei mai cunoscuți, anume: *acidul lisergic*, *ergolina, clavina* și *ergotamina.*



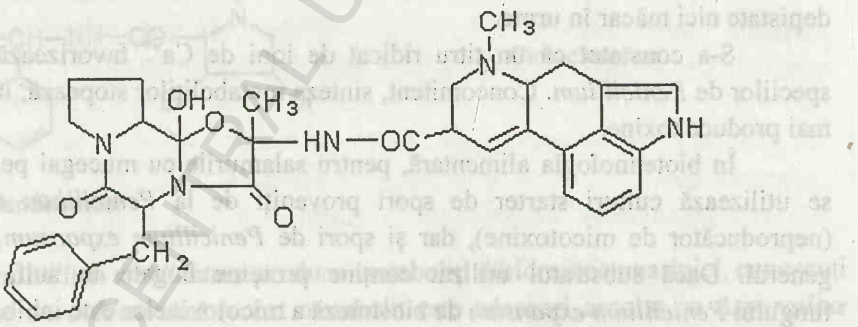
Acid lisergic



Ergolina



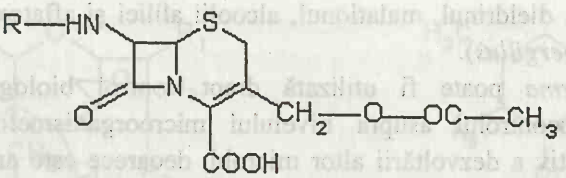
Clavina



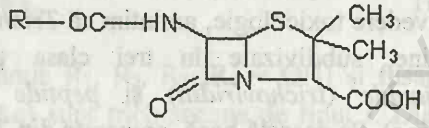
Ergotamina

Cephalosporium acremonium este un microb industrial, producător de antibiotice β-lactamice și steroidice, de aminoacizi precum valina și cisteina, fiind utilizat în biotehnologia farmaceutică și a aditivilor. Chiar dacă nu sintetizează compuși toxici asemănători afla-, ochra- sau rubratoxinelor, metaboliții acestei specii pot provoca fenomene de antibioză altor culturi celulare, în condiții aerobe.

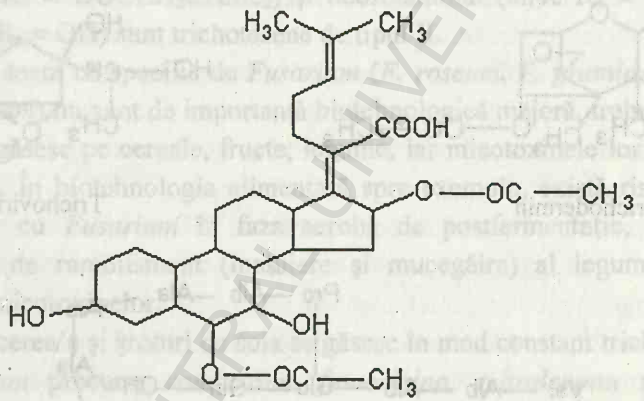
Printre antibioticele sintetizate de *Cephalosporium acremonium* se numără *cephalosporinele* și *penicilinele de tip N.*



Cephalosporina C (R = tripeptid)



Penicilina N



Cephalosporina P

Se constată că absența fosfatului anorganic reprezintă o condiție restrictivă pentru sinteza anibioticelor de mai sus.

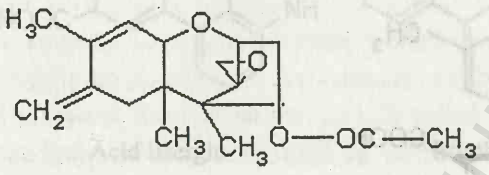
Speciile de *Trichoderma* (*Trichoderma viride*, *T. polysporum*, *T. reesei*, *T. harzianum*, *T. hamatus*, *T. koningii* etc.) sunt fungi cu atribuții industriale, producători de enzime extracelulare (spre exemplu, celulaze: celobiohidrolaze, endoglucanaze și celobiaze). Metabolizează substraturi variate, precum oze, polizaharide (celuloză, amidon), pectine etc., drept sursă de carbon. *Trichoderma lignorum* a fost chiar utilizată ca sursă pentru SCP (*Single Cell Protein*, respectiv biomasă), cu dezvoltare pe metanol. Calitățile depoluante ale acestui microorganism derivă din posibilitatea metabolizării hidrocarburilor din petrol, observându-se că solurile petroliere sunt populate cu *Trichoderma*.

Trichoderma sp. prezintă o capacitate biochimică deosebită de a hidroxila ciclurile aromatice, indolice și de a transforma diverse pesticide precum: araclorul,

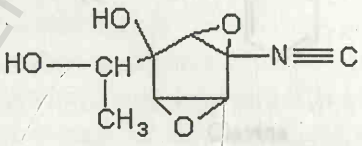
DDT-ul, aldrinul, dieldrinul, malationul, alcoolii alilici şi aflatoxinele (sintetizate de speciile de *Aspergillus*).

Trichoderma poate fi utilizată drept control biologic în evaluarea fungicidelor (biocontrolul asupra nivelului microorganismelor patogene ale plantelor), respectiv a dezvoltării altor microbi, deoarece este antagonică faţă de numeroşi alţi fungi. Antagonismul acestei specii se poate datora mai multor factori, anume: competiţia pentru mediu nutritiv, interacţia hifală urmată de liză (*Trichoderma* acţionează ca un parazit) şi producţia de antibiotice (bacteriocine).

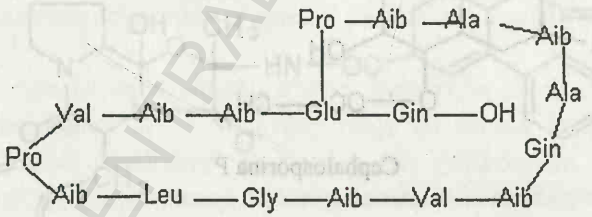
Din punct de vedere toxicologic, amintim că *Trichoderma* produce o gamă variată de micotoxine, subdivizate în trei clase principale: *tricothecene* (*trichodermin*), *izocianide* (*trichoviridin*) şi *peptide ciclice* cu proprietăţi antibiotice (*alamethicina*). Pe această bază, preparate din *Trichoderma polysporum* sunt utilizate ca fungicide, în vederea prevenirii micozelor.



Trichodermin

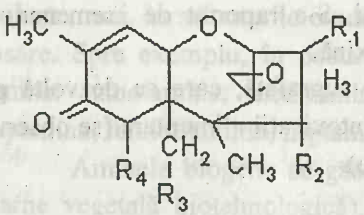


Trichoviridin

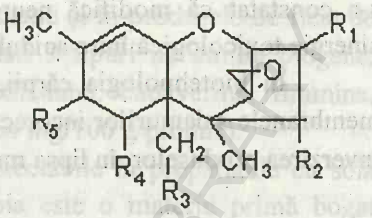


Alamethicina (peptidă ciclică)

Alături de *Trichoderma*, alte genuri de fungi sunt producătoare de trichotecene, precum: *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Trichotecium*, *Stachybotrys*, *Nigrospora*, *Cladosporium*, *Myrothecium* etc., dintre care unele au valoare biotehnologică. Grupul trichotecenelor cuprinde aproximativ 150 de reprezentanţi, dintre care 7 sunt elaboraţi în cantităţi semnificative (*toxina T-2*, *toxina HT-2*, *diacetoxiscirpenolul*, *neosolaniolul*, *fusarenona-X*, *nivalenolul* şi *deoxinivalenolul*, cunoscut sub denumirea de *vomitoxină*). Aceste toxine provoacă gastroenterite hemoragice grave. Trichotecenele au următoarele formule generale:



Trichotecene tip I



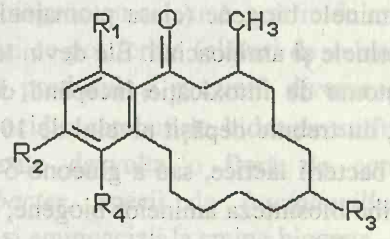
Trichotecene tip II

Nivalenolul (unde R_1, R_2, R_3 ,R_4 = OH) şi fusarenona-X (unde R_1, R_3, R_4 = OH, iar R_2 = OAc) sunt trichotecene de tipul I. Diacetoxiscirpenolul (unde R_1 = OH, R_2 = OAc, R_3 = OAc, R_4 = H), toxina T-2 (unde R_1 = OH, R_2 = OAc, R_3 = OAc, R_4 = $OOCCH_2CHMe_2$), toxina HT-2 (unde R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = OAc, R_4 = $OOCCH_2CHMe_2$) şi neosolaniolul (unde R_1 = OH, R_2 = OAc, R_3 = OAc, R_4 = OH) sunt trichotecene de tipul II.

Cu toate că speciile de *Fusarium* (*F. roseum*, *F. graminearum*, *F. solani*, *F. oxysporium*) nu sunt de importanţă biotehnologică majoră, trebuie să amintim că acestea se găsesc pe cereale, fructe, legume, iar micotoxinele lor sunt deosebit de periculoase. În biotehnologia alimentară spre exemplu, există riscul contaminării murăturilor cu *Fusarium* în faza aerobă de postfermentaţie, consecinţa fiind fenomenul de ramolisment (înmuiere şi mucegăire) al legumelor, o dată cu eliberarea micotoxinelor.

În cereale şi şroturi de soia se găsesc în mod constant trichotecene produse de *Fusarium* precum: *vomitoxina*, *fumonisina*, *zearalenona* şi *moniliformina* (extrasă din *Fusarium moniliforme* şi folosită ca erbicid). Zearalenona spre exemplu, ca şi majoritatea derivaţilor ei, are activitate estrogenică şi anabolică. Este un anticoncepţional şi inhibă spermatogeneza.

Zearalenona



Potenţial toxic prezintă şi *acidul fusaric* (*acid 5-butilpicolinic*) prin acţiunea sinergică cu aflatoxinele. Deşi acidul fusaric în sine este relativ netoxic,

s-a constatat că modifică neurochimia creierului. S-a raportat de asemenea, o sinergie toxicologică între acidul fusaric şi vomitoxină.

În biotehnologia cărnii, mucegaiurile de suprafață, care se dezvoltă pe membranele salamurilor incorect stocate, produc intoxicații alimentare (se observă înverzirea produselor, în lipsa mucegaiurilor nobile).

20.2. COMPUŞI TOXICI SINTETIZAȚI PE PARCURSUL PROCESELOR BIOTEHNOLOGICE

Bioprocesele prezintă aspecte toxicologice proprii. Materiile prime supuse proceselor fermentative (industrie farmaceutică, alimentație, obținerea biomasei etc.) suferă transformări biochimice pentru obținerea produselor dorite. Deseori, produsele finite sunt impurificate cu substanțe toxice, a căror apariție se datorează: fie enzimelor proprii materiilor prime, fie intervenției florei de contaminare (cu propriul echipament enzimatic), fie nerespectării unor parametri biotehnologici (prelucrare industrială defectuoasă).

În principal, suferă transformări biochimice cele trei grupe importante de compuşi constitutivi ai materiilor prime, anume: proteinele, lipidele şi glucidele, dar şi alte substanțe ca acizii organici, alcoolii, fenolii etc.

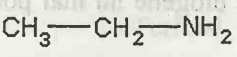
Spre exemplu, în biotehnologia alimentară, microflora spontană de pe carne, cu activitate proteolitică şi decarboxilazică intensă, duce la formarea ***aminelor biogene*** (tiramină, triptamină, cadaverină, putresceină, agmatina, histamină, feniletilenamină etc.) care au acțiune vasopresoare, devin toxice în cantități mari şi provoacă alergii severe, hiper- sau hipotensiune, stare de vomă, dureri puternice de cap, ulcere perforate, bronhospasme etc.

Aminele biogene (clasa ptomainelor, din grecescul *ptoma* = stârv) au ca sursă proteinele şi aminoacizii. Ele devin toxice la cantități de 1 g/1 kg produs, dar apar simptome de intoxicație începând de la 200 mg amină/kg produs (pentru histamină, nu trebuie depăşit nivelul de 10 mg/100 g produs). Utilizarea culturilor starter de bacterii lactice, sau a glucono-δ-lactonei în compoziția preparatelor din carne, inhibă biosinteza aminelor biogene, cantitățile care se formează totuşi, fiind sub limita toxică.

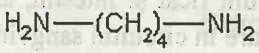
Nerespectarea normelor de salubritate, în biotehnologia produselor din carne, face ca flora psihrotropă (de alterare) să se dezvolte intens, chiar şi la 0°C, cu toate că optimul de temperatură se plasează între 20 şi 30 °C. Cele mai mari cantități de amine biogene s-au găsit în produsele de peşte sărat, pastele de peşte,

moluşte, raci, în salamurile crude, în extractul de carne şi în produsele de ficat de pasăre. Spre exemplu, în pasta de peşte s-au găsit 9 tipuri de amine biogene, anume: etanolamina, metilbutilamina, mercaptoetilamina, cadaverina, tiramina, dopamina, feniletilamina, triptamina şi histamina (64 mg/100 g produs).

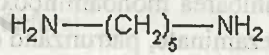
Aminele biogene se găsesc în cantităţi apreciabile în preparatele cu soia (carne vegetală biotehnologică), ştiut fiind că soia este o materie primă bogat proteică. De altfel, aminele biogene se găsesc în mod natural în cantităţi mai mari şi în alte vegetale precum: banane, prune, citrice, avocado, tomate, ananas. Ele persistă în sucurile de fructe, crescând frecvenţa leziunilor cardiace.



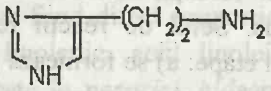
Etilenamina



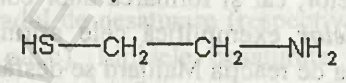
Putresceina



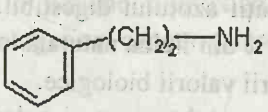
Cadaverina



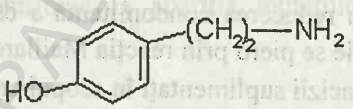
Histamina



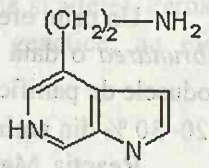
Cisteamina



Feniletilenamina



Tiramina



Triptamina

Pericolul formării în cantităţi mari a aminelor biogene apare şi în biotehnologia laptelui, în speţă la brânzeturile puternic maturate, unde cantitatea de aminoacizi liberi este crescută (aminele biogene au ca sursă o serie de aminoacizi alifatici şi aromatici). În aceste brânzeturi se pot forma (alături de substanţele de aromă), şi alţi compuşi ce degradează produsul şi prezintă diverse grade de toxicitate, precum: amoniac, mercaptani, acid α-cetobutiric, hidrogen sulfurat etc.

De asemenea, în lapte se poate dezvolta o floră de contaminare (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Achromobacter*, specii de *Lactobacillus* şi de *Pediococcus*) care degradează proteinele şi aminoacizii la amine biogene.

În varza, morcovii şi sfecla murată s-au pus în evidenţă amine biogene (cadaverină, putresceină, histamină, tiramină) produse prin activitatea metabolică a florei de contaminare, dar şi a microorganismelor utilizate în biotehnologie

(*Pediococcus cerevisiae*, *P. pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*).

Vinul şi berea pot conţine cantităţi apreciabile de amine biogene (în speţă tiramină), care se formează ca rezultat al proceselor fermentative ale drojdiilor.

În faze avansate de degradare, aminoacizii (mai ales cei aromatici) suferă procese de dezaminare, decarboxilare, oxidare şi sunt transformaţi în produşi tipici de putrefacţie, toxici, precum fenolul, crezolul, scatolul, indolul etc.

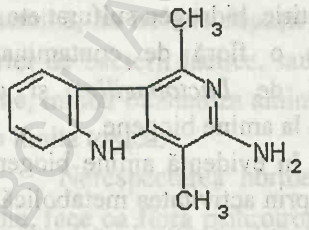
Consumul produselor alimentare bogate în amine biogene, concomitent cu ingerarea unor medicamente antidepresive, poate provoca creşterea tensiunii arteriale, dureri occipitale, hemoragii cerebrale, uneori cu sfârşit letal (prin inhibarea monoaminooxidazei din ficat şi intestin, aminele biogene nu mai pot fi dezaminate, pătrunzând ca urmare în circuitul sangvin).

Procesarea alimentelor bogate în proteine şi glucide reducătoare implică de multe ori tratamente termice. Aceste tratamente influenţează atât valoarea nutritivă a proteinelor, cât şi formarea unor compuşi toxici. Reacţia Maillard de formare a ***melanoidelor*** exemplifică cele afirmate mai sus. Setul de reacţii reunite sub denumirea de reacţia Maillard se desfăşoară în trei etape: a) se formează prin adiţie aldozamine şi cetozamine; b) au loc reacţii complexe de scindare, deshidratare; c) au loc reacţii de condensare aldolică, polimerizare, formare de heterociclii numiţi melanoide, în general produse nesaturate, fluorescente şi colorate.

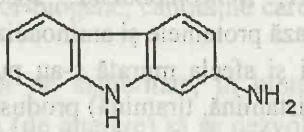
Un prim efect vizibil asupra produselor (din lapte, din carne mai puţin) este *îmbrunarea* o dată cu reducerea concomitentă a cantităţii azotului digestibil. La produsele de panificaţie se pierd prin reacţia Maillard 10% din lizina naturală totală şi 20–30 % din aminoacizii suplimentaţi în scopul creşterii valorii biologice.

Reacţia Maillard contribuie în mod esenţial la gustul, aroma şi culoarea produselor biotehnologice alimentare. O parte dintre compuşii rezultaţi din reacţia Maillard, care prezintă toxicitate, determină leziuni hepatice necrotice şi manifestări cirotice. Se observă concomitent hipertrofia ficatului, a rinichiului şi fenomene alergice.

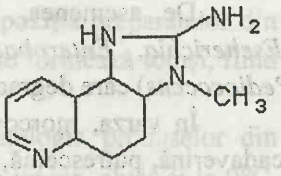
O serie de substanţe mutagene care se formează la tratamentul termic al alimentelor sunt: pirolizatele de triptofan tip I şi II, ultimul fiind un pirolizat de globulină din soia şi pirolizatul din sardine.



Pirolizat de triptofan (tip I)

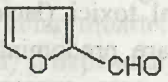


Pirolizat de globulină (tip II)

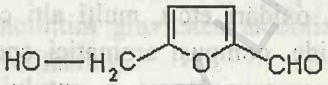


Pirolizat de sardină

Tratamentele termice în mediu acid au efect asupra pentozelor şi hexozelor din materiile prime, care suferă o rearanjare moleculară cu apariţia unui nucleu furanic (furfural, hidroximetil-furfural). ***Furfuralii*** din produsele biotehnologice alimentare modifică gustul acestora şi alterează funcţiile hepatice. De asemenea, determină creşterea nivelului betaglobulinelor din sânge, o dată cu hipertrofia ficatului.

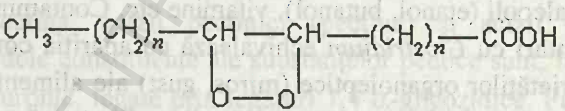


Furfural

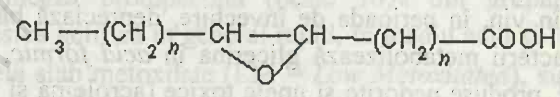


Hidroximetilfurfural

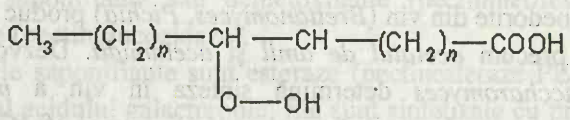
Lipidele din materiile prime (spre exemplu în biotehnologia cărnii vegetale obţinută din soia) suferă de asemenea modificări la tratamentele termice, degradarea fiind direct proporţională cu gradul de nesaturare (respectiv cantităţile de acid linolenic, acid linoleic şi acid oleic). Lipidele nesaturate degradate, transformate în *peroxizi*, *hidroperoxizi* sau *epoxizi* influenţează negativ procesele fiziologice ale organismelor vii (produc hipertrofia ficatului, perturbă metabolismului vitaminelor liposolubile, modifică activitatea enzimatică tisulară, perturbă reproducţia, determină procese necrotice pe mucoasa stomacală şi altele). Peroxizii au o acţiune citotoxică, contribuie la apariţia mutaţiilor genetice, au efecte teratogene şi cancerigene.



Epoxiperoxid



Epoxid



Hidroperoxid

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Râncezirea grăsimilor poate avea loc şi prin reacţii de autooxidare la aer, fenomen întâlnit în biotehnologia produselor de panificaţie, unde se utilizează diferite făinuri cerealiere. Astfel, în făina de grâu are o pondere mărită acidul linoleic (acid gras nesaturat). Lipoxigenazele proprii făinii şi cele microbiene utilizate în panificaţie, deşi contribuie la maturarea făinii, au o acţiune oxidativă (de râncezire) asupra acestui acid.

În afară de peroxizi se pot forma prin procese complexe (scindări, polimerizări, oxidări etc.), mulţi alţi compuşi potenţial toxici (lactone, alcooli, esteri, aldehide, compuşi aromatici epoxidaţi), între care predomină aldehidele. Stocarea necorespunzătoare a untului şi margarinei, spre exemplu, duce la descompunerea lecitinelor şi apariţia unei cantităţi mari de *trimetilamină* (miros de peşte).

Grăsimile (gliceridele) suferă de asemenea, procese de hidroliză şi de hidrogenare (cele nesaturate). Prin hidroliza gliceridelor se eliberează glicerolul, care la tratamente termice, prin deshidratare, trece în *acroleină* (substanţă cancerigenă).

Transformările suferite de lipide pot avea loc şi pe cale enzimatică, sub influenţa unor microorganisme de contaminare ale produselor biotehnologice (*Bacillus*, *Aerobacter*).

Bacteriile obligat anaerobe, sporulative, din genul *Clostridium*, degradează substanţe cu un număr mare de atomi de carbon, cu formare de diverşi compuşi chimici, unii folosiţi drept combustibili (de exemplu, *hidrogen* şi *metan*). Fermentează de asemenea, hexozele cu obţinere de acizi organici (acetic, butiric, caproic, acrilic), alcooli (etanol, butanol), vitamine etc. Contaminarea culturilor de lactobacili alimentari cu *Clostridium* echivalează cu apariţia compuşilor toxici şi deprecierea proprietăţilor organoleptice (miros, gust) ale alimentelor. Dezvoltarea speciilor de *Clostridium* la fermentarea murăturilor, determină apariţia în cantităţi mari a *acidului butiric*, rău mirositor şi toxic.

Proliferarea unor bacterii nedorite (*Bacillus amaracrylus*, *Bacillus tartarophtorum*) în vin, în perioada de învechire, depreciază băutura care devine amară. Aceste bacterii metabolizează glicerina în *acid formic*, *acid acetic*, *acid acrilic*, *acroleină*, produse nedorite şi unele toxice (acroleina şi acidul acrilic sunt potenţial cancerigene). Acroleina astfel obţinută se combină cu fenolii din struguri şi se obţin compuşii amari.

Drojdiile nedorite din vin (*Brettanomyces*, *Pichia*) produc alte substanţe ce modifică aroma, precum *acetatul de amil* şi *acetamida*. Dezvoltarea intensă a drojdiei *Schizosaccharomyces* determină sinteza în vin a *mercaptanilor* şi *hidrogenului sulfurat*, care depreciază vinul, putând provoca afecţiuni digestive.

În biotehnologia amidonului şi spirtoaselor, culturile de drojdii însămânţate, cât şi plămada ieşită de la zaharificare, necesită un control

microbiologic sever pentru a depista eventualele contaminări cu bacterii patogene (sub $2 \cdot 10^6$ bact./ml) sau fungi toxigeni. O serie de bacterii formează acroleină în plămadă (prin deshidratarea glicerinei). Alcoolul brut nu trebuie să conţină mai mult de 0,2 mg acroleină / 100 ml alcool).

Biotehnologia băuturilor alcoolice evidenţiază o serie de aspecte toxicologice importante. Simpla ingerare a unor cantităţi mari de *alcool* provoacă stări toxice, de la migrene până la come alcoolice, ciroze hepatice, delirium tremens şi chiar moarte. E necesar să amintim gravitatea alcoolismului cronic (dipsomania) şi dependenţa faţă de alcool (etilismul).

În băuturile alcoolice a fost identificat şi *alcoolul metilic*. Toxicitatea băuturilor alcoolice creşte cu atât mai mult cu cât alcoolul metilic şi alcoolul etilic manifestă o acţiune sinergică. Peste 0,3% alcool metilic în băuturi determină apariţia simptomelor specifice de intoxicaţie metilică (cefalee, tulburări de vedere, chiar moarte).

Obţinerea de biomasă pornind de la CO_2 şi H_2, prin utilizarea tulpinilor de *Hydrogenomonas* poate prezenta la rându-i un aspect toxicologic, legat de acumularea *acidului poli-β-hidroxibutiric* în mediu până la 23%, în situaţia în care procesul biotehnologic are loc cu oxigen ca factor limitativ.

Biotehnologia sucurilor şi conservelor de legume şi fructe prezintă de asemenea, unele aspecte toxicologice. Spre exemplu, fluidificarea sucurilor de fructe este uşurată de adaosul preparatelor enzimatice pectolitice (de origine vegetală sau microbiană), care acţionează asupra substanţelor pectice. Substanţele pectice conţin un amestec de compuşi carbohidraţi coloidali, cu consistenţă de gel, precum: protopectina, acizii pectinici (pectina) şi acizii pectici (pectaţii). Heteropolizaharidele constituente ale substanţelor pectice sunt, în principal, unităţi de acid D-galacturonic, legate prin legături 1,4-α-glicozidice. Funcţiunile carboxil ale resturilor de acid galacturonic sunt esterificate cu grupări metil.

Moleculele înalt esterificate (metoxilate – HM din engleză: *High Metoxilated*) formează protopectină (peste 70% din grupările carboxil sunt esterificate). Acestea gelifică în general rapid, în mediu acid şi la concentraţii mari de zahăr. Pectinele slab metoxilate (LM – *Low Metoxilated*), sub 50%, gelifică în prezenţa ionilor de Ca^{2+} şi cu zahăr puţin. Pectinele nemetoxilate se cunosc sub denumirea de acizi pectici. În principal, enzimele pectolitice se pot înscrie în două clase: enzime saponifiante sau demetoxilante (pectinmetilesteraze) şi enzime depolimerizante (pectinglucozidaze).

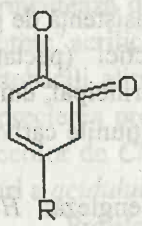
Enzimele saponifiante sunt esteraze (pectinesteraze PE) care hidrolizează esterul metilic al acidului galacturonic. Ele sunt sintetizate cu precădere de bacterii (*Clostridium multifermentas*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas vasculorum*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia cartovora*), de fungi (*Alternaria brassicae*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*,

Penicillium crysovorum) și mai puțin de drojdii (*Saccharomyces vini*). Se găsesc, de asemenea, în pepeni, roșii, mere, pere etc.

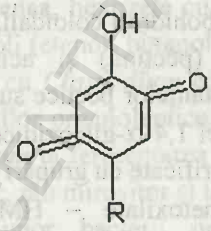
Enzimele depolimerizante sunt glicozidaze care hidrolizează legăturile 1,4-α-glicozidice, având drept consecință scăderea gradului de polimerizare. Dintre acestea se evidențiază: polimetilgalacturonazele și pectinliazele ce atacă acidul pectinic, iar poligalacturonazele și pectatliazele atacă acidul pectic. Toate aceste enzime sunt active între 8 și 55 °C. Se utilizează în industria sucurilor, vinului, ceaiului, cafelei, ca adaos la furaje (cresc digestibilitatea furajelor celulozice). În toate aceste domenii, produc lichefierea parțială a țesuturilor vegetale, micșorează vâscozitatea, limpezesc sucurile, musturile și măresc filtrabilitatea.

Dacă preparatele enzimatice adăugate sucurilor de legume și fructe conțin cantități importante de pectinmetilesteraze, se formează *alcool metilic* în suc, extrem de toxic. Aceste enzime sunt înlocuite de obicei cu pectinliaze, care depolimerizează pectinele fără să le demetileze, deci fără să apară alcoolul metilic.

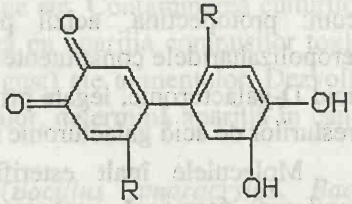
Produsele vegetale conțin în mare măsură fenoli. Sub influența polifenoloxidazelor (catecoloxidaze, lacaze), diverșii fenoli suferă procese de ***îmbrunare enzimatică***, prin transformare în chinone (o-quinona, p-hidroxi-quinona, dimer chinonic etc.), care polimerizează obținându-se compuși colorați. Acești compuși de îmbrunare modifică aspectul și calitatea produselor biotehnologice vegetale și sunt relativ toxici, datorită potențialului oxidant pe care-l dețin. Îmbrunarea enzimatică poate fi încetinită prin adaosuri de substanțe reducătoare (acid ascorbic spre exemplu).



o-Quinona



p-hidroxi-Quinona



Dimer quinonic

În biotehnologia obținerii biomasei (spre exemplu, *Candida lipolitica* și *Candida tropicalis*), sub forma proteinelor monocelulare (SCP – *Single Cell Protein*) pe substraturi de n-alcani sau motorină (Petro-proteine), s-a pus problema remanenței în produsul final a unor compuși potențial cancerigeni. Aceștia (*hidrocarburi carcinogene*), puțin solubili sau insolubili în apă, nu au putut fi îndepărtați în totalitate din biomasă. Totodată, SCP sunt pasibile de contaminare cu microorganisme patogene sau toxigene (fungi producători de micotoxine), fapt ce impune condiții speciale de conservare și stocare.

SCP pot conține rezidii de ***metale grele***, săruri minerale sau solvenți utilizați în procesele tehnologice, ce trebuie îndepărtați, fiind toxici.

Aceste evidențe au determinat Marea Britanie și Italia să renunțe la așa-zisele *petro-proteine* și să utilizeze ca substrat alcoolii (metanolul în speță), deșeurile agricole sau lemnoase, la obținerea de biomasă. Metanolul se solubilizează bine în faza apoasă, în care se purifică biomasa, așa încât nu există pericol toxic referitor la acest substrat. S-a constatat că jumătate din costul acestui tip de biomasă se datorează obținerii metanolului.

Nu trebuie desconsiderată problema purificării enzimelor care se utilizează în biotehnologii. Activitățile enzimatice parazite, ale unor enzime care nu au fost îndepărtate la purificarea preparatului enzimatic dorit, catalizează sinteza unor compuși nedoriți, dintre care o parte pot fi toxici.

20.3. EFECTELE TOXINELOR PREEXISTENTE ÎN MATERIILE PRIME UTILIZATE ÎN BIOTEHNOLOGII

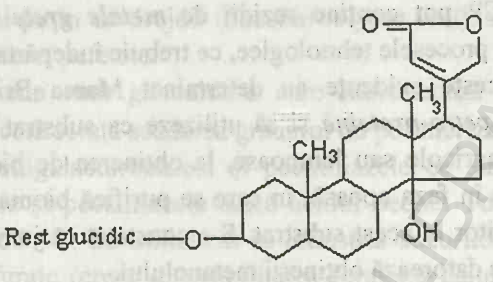
Materiile prime alimentare (de origine vegetală sau animală) utilizate în biotehnologii, conțin deseori compuși potențial toxici sau substanțe cu caracter antinutritiv, care pot interveni în utilizarea digestivă a proteinelor, a substanțelor minerale și care inactivează sau diminuează activitatea vitaminelor.

În leguminoase (leguminoasele constituie o sursă bogată de proteină în biotehnologia alimentară), cartofi, arahide, germeni de grâu, se găsește o clasă de substanțe proteice numite ***fitohemaglutinine*** (***lectine***), care au capacitatea de a aglutina eritrocitele, de a inhiba creșterea și în unele cazuri de a produce „gușă endemică". Deoarece favorizează eliminarea exagerată a hormonilor tiroidieni prin intestin, fitohemaglutininele se cunosc sub denumirea de ***tirotoxină***. Lectinele pot fi inactivate prin tratament termic.

În soia s-au pus în evidență ***inhibitori tripsinici***, capabili să reducă activitatea enzimelor proteolitice din sucurile digestive, având ca urmare reducerea gradului de utilizare a azotului și perturbarea procesului de absorbție al unor aminoacizi.

O altă clasă de inhibitori de origine vegetală sunt ***saponinele***. Din punct de vedere chimic, saponinele sunt glicozizi la care agliconii pot fi steroidici sau triterpenoidici. Amintim o serie de saponine: *digalonină*, *digitonină*, *tigonină* (cu agliconi steroidici), *escină*, *fitolacatoxină*, *ciclamină*, *gratiolină*, *hederină* (cu agliconi triterpenoidici) etc. Saponinele hemolizează eritrocitele, pot inhiba enzimele sucurilor gastrice și au capacitatea de a emulsiona grăsimile.

Digitonina



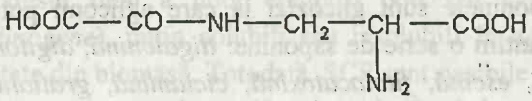
Acidul fitic este o substanță care influențează nivelul absorbției diferitelor metale. Acest compus se găsește în rădăcinile, frunzele și semințele cerealelor, leguminoaselor, oleaginoaselor etc. Acidul fitic formează săruri numite ***fitați***, cu metalele preluate din alimente. Fitații alcalini sunt solubili, iar fitații de Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Pb sunt insolubili chiar și la pH foarte acid. În consecință, un exces de acid fitic va produce o carență de metale bivalente cu rol fiziologic important, precum Ca sau Mg. Spre exemplu, 200 g pâine neagră, bogată în acid fitic, determină eliminarea sub formă de fitat a Ca oferit de 200 ml lapte.

Același efect îl au ***acidul oxalic*** și ***oxalații*** solubili alcalini din plantele oxalifere (spanac, măcriș, agrișe etc.), care prin formarea oxalaților de Ca insolubili, determină pierderea acestui element (2,25 mg acid oxalic precipită 1 mg Ca). Carența în Ca produce dereglări metabolice deosebite (sistemului osos, sistemului nervos etc.).

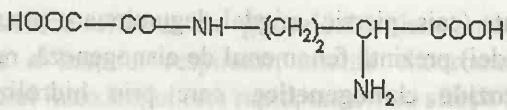
Plantele pot conține toxine deosebit de puternice precum ***acidul monofluoracetic*** (se găsește în cantitate mare în *Dichapetalum cymosum*). Acest acid se substituie acidului acetic în metabolism și afectează respirația tisulară prin inhibarea ciclului Krebs.

Proteinele sunt constituite dintr-o gamă variată de ***aminoacizi***, dintre care unii, ingerați în cantități mari, își manifestă toxicitatea. Astfel, ***metionina*** este mai toxică decât triptofanul, treonina și lizina. Studii pe șoareci au confirmat faptul că metionina încetinește creșterea și produce leziuni tisulare.

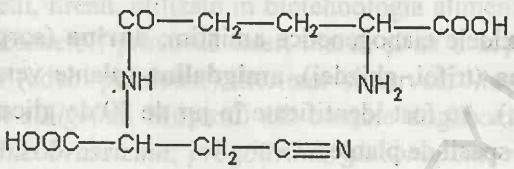
Semințele unor plante din genul Lathyrus conțin aminoacizi precum: *acidul β-N-oxalil-α,β-diaminopropionic*, *acidul γ-N-oxalil-α,γ-diaminobutiric*, *acidul γ-glutamil-β-cianoalanina* și *acidul γ-glutamil-β-amino-propionitril*, care provoacă maladia numită *lathyrism* (leziuni osoase, cartilaginoase și ale sistemului nervos).



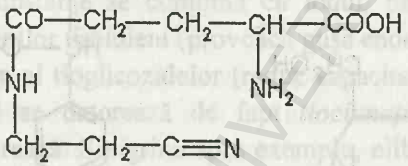
Acidul β-N-oxalil-α,β-diaminopropionic



Acidul γ-N-oxalil-α,γ-diaminobutiric

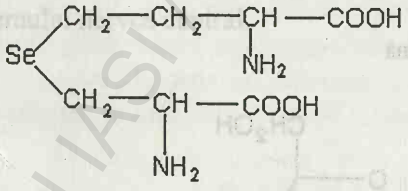


Acidul γ-glutamil-β-cianoalanina

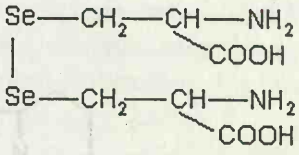


Acidul γ-glutamil-β-amino-propionitril

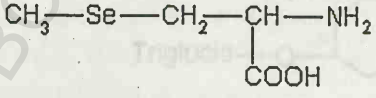
O serie de cereale cultivate pe terenuri selenifore conțin aminoacizi cu seleniu, anume: **selenocistationina**, **metil-selenocisteina**, **selenocistina**, **selenometionina**. Intoxicațiile cu seleniu au caracter cronic și se manifestă prin căderea părului, deformarea formațiunilor cornoase (copite, unghii), dermatite, artrite. Aminoacizii cu seleniu precum selenometionina și selenocisteina intră în competiție cu aminoacizii cu sulf, la biosinteza proteinelor. Ei se regăsesc în carnea, laptele și ouăle animalelor furajate cu cereale cultivate pe terenuri selenifore și mai apoi, în produsele biotehnologice alimentare.



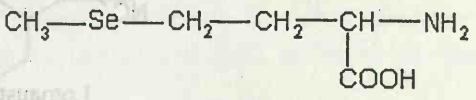
Selenocistationina



Selenocistina



Metil-selenocisteina

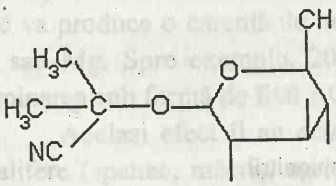


Selenometionina

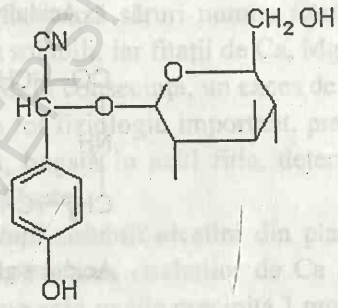
BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Diferite plante (cais, piersic, migdal, leguminoase precum trifoi, sorg, in, iarbă de Sudan, ghizdei) prezintă fenomenul de cianogeneză, respectiv capacitatea de a sintetiza **glicozide cianogenetice**, care prin hidroliză eliberează acid cianhidric. Aceste plante sunt toxice în stare verde, dar pierd din toxicitate prin uscare. O parte dintre leguminoasele cu glicozizi sunt folosite ca materii prime în biotehnologii.

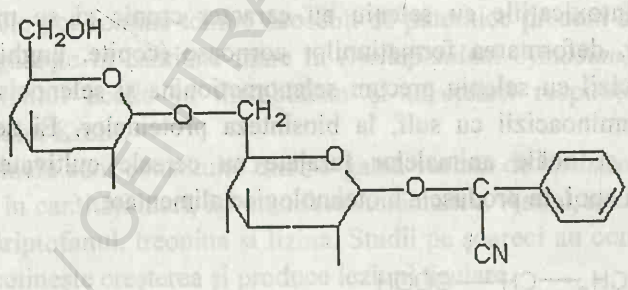
Dintre glicozidele cianogenetice amintim: **durina** (sorg), **linamarina** (in, trifoi), **lotoaustralina** (trifoi, ghizdei), **amigdalina** (plante verzi, migdal, zarzăr), **sambunigrina** (prun). Au fost identificate în jur de 30 de glicozide cianogenetice în aproximativ 1000 specii de plante.



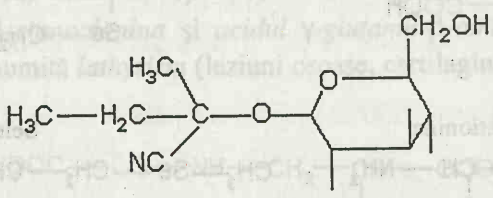
Linamarina



Durina



Amigdalina



Lotoaustralina

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

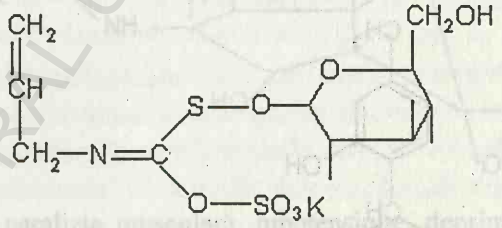
Acidul cianhidric eliberat de glicozidele cianogenetice şi sărurile lui blochează o enzimă a lanţului respirator, anume citocromoxidaza, producând asfixie celulară. Efectul intoxicaţiei este rapid, uneori cu sfârşit letal.

Tioglicozidele sunt de asemenea toxice, datorită formării izotiocianaţilor. Tioglicozide se găsesc în uleiul de muştar (muştar alb, muştar negru), varză, conopidă, napi, ridichi, hrean, utilizate în biotehnologia alimentară. Tioglicozidele sunt iritante ale mucoaselor, provoacă icter, diaree şi au o acţiune nefastă asupra sistemului respirator (edem pulmonar), excretor şi nervos. Muştarul negru conţine un tioglicozid numit *sinigrină*. Muştarul alb conţine tioglicozidul *sinalbina*. Alte tioglicozide sunt: *glucobrassicina*, *progoitrina*, *gluconapina*, *neoglucobrassicina*, *gluconasturtiina*, *glucoalissina*, *glucorafanina*.

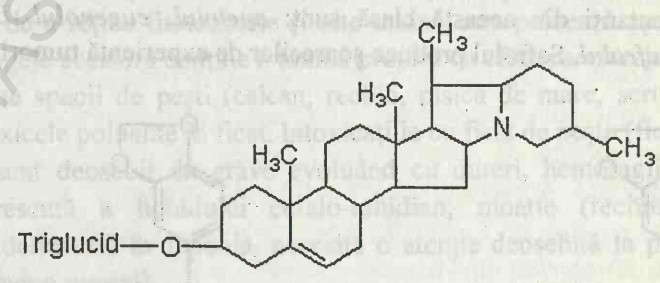
Glicozidele îşi manifestă toxicitatea mai ales prin faptul că au acţiune antitiroidiană. Aceste substanţe se combină cu iodul, perturbând metabolismul normal al sintezei hormonilor tiroidieni (provoacă guşa endemică).

Efectul goitrogen al tioglicozidelor (reduc capacitatea glandei tiroide de a utiliza iodul din dietă) se datorează de fapt *tiocianaţilor*, *izotiocianaţilor* şi *nitrililor*, pe care-i eliberează. Sinigrina spre exemplu, eliberează *alil-izotiocianat* ($CH_2 = CH - CH_2 - N = C = S$).

Sinigrina

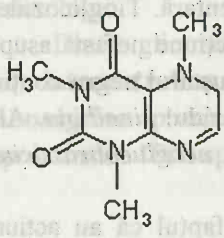


O altă grupă de glicozide din materiile prime vegetale sunt ***glico-alcaloizii***, precum *solanina* din cartof şi *tomatina*. Aceste substanţe au proprietăţi farmacodinamice şi toxice foarte active, acţionează asupra miocardului, musculaturii şi sistemului nervos central.

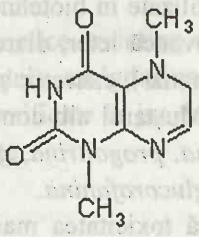


Solanina

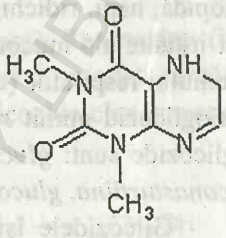
Preparatele din cafea, cacao, ceai, de multe ori fermentate după metode biotehnologice (se utilizează mai ales în Orient), conțin ***alcaloizi metilxantinici*** precum: *cafeina*, *teobromina* și *teofilina*. Metilxantinele acționează asupra sistemului circulator și respirator (cresc tensiunea și ritmul respirației), provoacă stări de greață și anxietate.



Cafeina

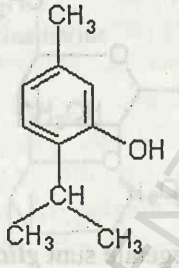


Teobromina

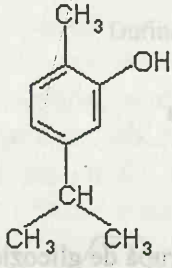


Teofilina

În toate vegetalele se găsesc ***derivați fenolici***, majoritatea fiind fiziologic activi. Derivații fenolici intervin în fosforilarea oxidativă, produc halucinații, spasme și interferă cu metabolismul vitaminelor cu structuri asemănătoare (vitaminele E și K). Ca reprezentanți fenolici amintim *timolul* și *carvacrolul*, decelabili și în cimbru, în chimion, plante utilizate ca aromatizanți.

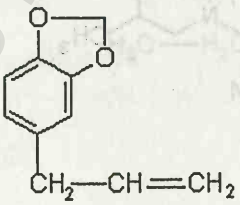


Timol

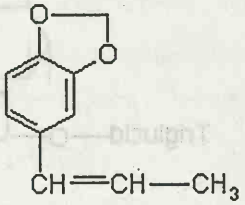


Carvacrol

Dintr-o serie de plante se extrag uleiurile eterice, care conțin ***eteri fenolici***. Aceștia se caracterizează printr-o catenă laterală nesaturată (alil sau propenil). Câțiva reprezentanți din această clasă sunt: *anetolul*, *eugenolul*, *izoeugenolul*, *safrolul* și *izosafrolul*. Safrolul produce șoarecilor de experiență tumori hepatice.



Safrol

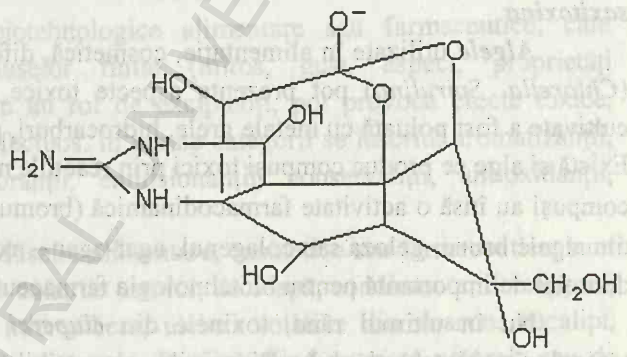


Izosafrol

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Biotehnologia peştelui şi a materiilor prime oferite de mare sau de apele dulci (moluşte, alge), prezintă aspecte toxicologice proprii. Există aproximativ 300 specii de peşte, frecvente în Marea Caraibelor şi în Oceanul Pacific, care preiau o toxină extrem de puternică, anume ***ciguatoxina***, de la flagelatul Diplopsalis (flagelatul este ataşat de algele Schizothnix calciola, de unde se contaminează cu această toxină). Prin lanţul trofic toxina se răspândeşte cu uşurinţă la speciile de peşte comestibile. Ciguatoxina (ciguatera) modifică balanţa ionică a membranelor celulelor sistemului nervos, provoacă crampe abdominale, tulburări de vedere, dureri de cap, dureri musculare, paralizie, convulsii, moarte. Practic, toxina inhibă colinesteraza, asemănător pesticidelor organofosforice şi nu se distruge la fierbere, afumare sau congelare.

O altă toxină extrem de puternică ***tetrodotoxina***, se găseşte în epidermul, ficatul şi icrele peştilor din genul Tetrodon (Fugu). Toxina a fost evidenţiată de asemenea, în laptii şi icrele morunului în perioada de reproducere.



Tetrodotoxina

Tetrodotoxina produce paralizie musculară, hipotensiune, deprimă respiraţia şi dereglează buna funcţionare a sistemului digestiv. Icrele de mreană (uneori şi de somn) sunt considerate toxice, ca de altfel toate icrele în perioada de reproducere a peştilor.

În sângele anghilelor, peştelui torpilă şi mrenelor se găseşte o ***hematotoxină*** foarte puternică ce provoacă paralizie respiratorie. Ţiparii au proprietatea de a reţine fitotoxinele şi alte toxine care poluează apele, dar pielea, ficatul şi sângele acestora conţine o toxină proprie cu efect parestezic.

Multe specii de peşti (calcan, rechin, pisica de mare, scrumbia spaniolă etc.) reţin toxicele poluante în ficat. Intoxicaţiile cu ficat de peşte (ficatul nu trebuie consumat) sunt deosebit de grave evoluând cu dureri, hemoragii, vomismente, presiune crescută a lichidului cefalo-rahidian, moarte (rechinul *Heptancus cinereus*, o delicatesă în Japonia, necesită o atenţie deosebită la preparare, altfel consumul devine mortal).

Scrumbiile şi tonul (alb, roşu), mult utilizaţi în biotehnologia preparatelor de peşte, conţin în ţesutul muscular o toxină liposolubilă numită ***sarcotoxină***, care dă fenomene de intoxicaţie inclusiv peştelui de la care provine. Sardinele şi macroul conţin o ***scombrotoxină*** alergogenă, identificată ca fiind de fapt o amină biogenă, anume *histamina*. Sardinele, ca şi heringii, mai pot produce intoxicaţii prin ***clupeotoxină*** (manifestări digestive acute şi se poate ajunge la colaps cardiovascular), care este din fericire uşor de îndepărtat, fiind termolabilă.

Din peştele sărat au fost izolate mai multe tipuri de ***micotoxine***, provenite de la flora de contaminare existentă înainte de începerea procesului biotehnologic de preparare, şi care a fost distrusă pe parcurs.

Flagelatele sunt surse de toxine şi pentru moluştele care le consumă. Aceste flagelate sunt răspândite practic în oceane din zona polară până la tropice, aşa încât toxinele emise nu pot fi evitate. Moluştele pot transmite în aceste condiţii o neurotoxină paralitică cu efect inhibitor asupra cordului şi respiraţiei, anume *saxitoxina*.

Algele utilizate în alimentaţie, cosmetică, diferite industrii sau ca biomasă (*Chlorella*, *Spirulina*) pot prezenta aspecte toxice, dacă zona în care au fost cultivate a fost poluată cu metale grele, hidrocarburi, pesticide, deşeuri radioactive. Există şi alge ce produc compuşi toxici prin reacţiile metabolice. Mulţi dintre aceşti compuşi au însă o activitate farmacodinamică (bromura de potasiu, iodul – extrase din algele brune; geloza sau colagenul, agar-agar – extrase din algele roşii şi verzi) deosebit de importantă pentru biotehnologia farmaceutică.

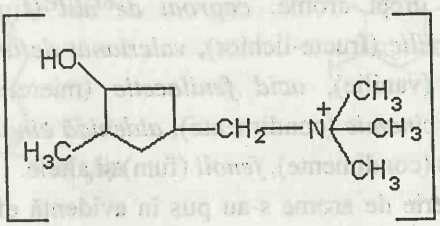
Nu în ultimul rând, toxinele din ***ciuperci*** ocupă un loc important în toxicologia biotehnologică. Ciupercile comestibile sunt fungi care cresc pe materialele celulozice, fiind mari producători de antibiotice şi compuşi anticanceroşi. Producţia de ciuperci este un proces fermentativ. Cea mai răspândită este ciuperca *Agaricus bisporus*, care reprezintă 70% din totalitatea ciupercilor cultivate şi poate creşte pe paie cu adaosuri de compuşi cu azot.

O altă ciupercă comestibilă, *Lentinula edodes* creşte direct pe lemn, cu mare viteză, recoltele succedându-se la 7–10 zile. *Lentinula* se cultivă de 2000 de ani, fiind a II-a ca producţie mondială, după *Agaricus*.

Unele ciuperci otrăvitoare precum *Amanita phalloides* (alb-gălbuie la culoare) pot fi confundate cu ciupercile comune. Toxinele ciupercii sunt: *falina* care este o hemolizină, 5 *amatotoxine* (octopeptide ciclice) şi 4 *falatoxine* (heptapeptide ciclice). Acestea provoacă intoxicaţii extrem de grave, mortale în marea majoritate a cazurilor. Falina distruge eritrocitele şi determină fenomenul de asfixie celulară. *Muscarina* din *Amanita muscaria* şi *Amanita pantherina* este un alcaloid cu efect asupra sistemului nervos şi aparatului digestiv.

Speciile de ciuperci netoxice devin toxice prin încrucişare cu ciuperci toxigene, fenomen observat deseori.

Muscarina

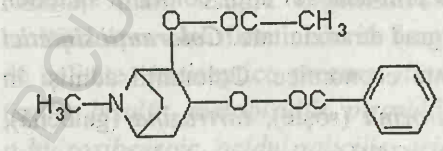


20.4. TOXICITATEA UNOR ADITIVI AI PRODUSELOR BIOTEHNOLOGICE

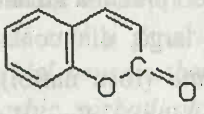
Aditivii produselor biotehnologice alimentare sau farmaceutice, care îmbunătăţesc calităţile produselor finite (miros, gust, aspect, proprietăţi stimulatoare), le colorează sau au rol de excipienţi, pot provoca efecte toxice, legate în special de dozajul defectuos. În aceste categorii se înscriu: aromatizanţii, potenţiatorii de aromă, coloranţii, emulsionanţii, conservanţii, antioxidanţii, îndulcitorii.

Aromele adăugate produselor alimentare, cosmetice sau farmaceutice, sunt extrem de variate (de cafea, de cola, de usturoi, de ceapă, condimente, de căpşuni, muştar, cocos, nuci, vanilie, miere, bere, uleiuri volatile: din anason, eucalipt, cimbru, grape-fruit, mandarină, portocale, lămâie), fiind extracte naturale sau de sinteză, care pot să prezinte o anumită toxicitate.

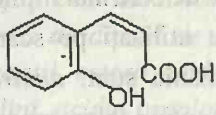
Spre exemplu, componentele principale ale extractului de cola sunt o serie de alcaloizi precum: cafeina, teobromina şi teofilina, cu acţiune excitantă asupra sistemului nervos, potenţial toxice (v. subcapitolul 20.3). Extractele de coca conţin, de asemenea, o serie de alcaloizi, între care predomină *cocaina*. Uleiul de grape-fruit conţine o serie de *derivaţi cumarinici* (*cumarina*, *acidul cumaric*), activi asupra nervilor optici, motiv pentru care aceşti compuşi trebuie înlăturaţi şi o serie de compuşi amari (*naringina*).



Cocaina



Cumarina



Acid cumaric

Aromele de sinteză sunt toxigene în marea lor majoritate, dozarea cantităților necesitând atenție deosebită. Prezentăm câteva tipuri de substanțe sintetice, utilizate drept arome: *caproat de alil* (fructe), *izotiocianat de alil* (muștar), *alcool amilic* (fructe-lichior), *valerianat de amil* (nuci), *metilfenilacetat* (miere), *vanilina* (vanilie), *acid fenilacetic* (miere, bere), *aldehidă octilică* (portocale), *alcool cinamic* (condimente), *aldehidă cinamică* (migdale), *butirat de amil* (unt), *carvona* (condimente), *fenoli* (fum) și altele.

Pentru o serie de arome s-au pus în evidență efecte embriotoxice. *Acidul fenilacetic* spre exemplu, inhibă dezvoltarea sistemului osos în faza embrionară. *Aldehida benzoică* inhibă competitiv dehidrogenaza glutamică.

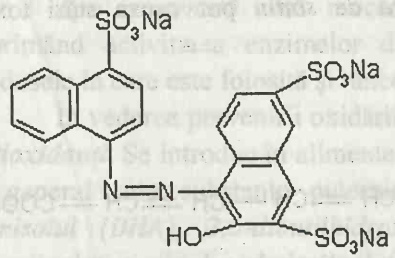
Multe arome se obțin din amestecuri de substanțe, ca urmare potențialul toxigen crește. Astfel, printre componenții aromei de carne se găsesc: *acidul formic*, *acidul acetic*, *aldehida formică*, *aldehida acetică*, *aldehida hexanoică*, *alcooli* (de la *metanol* la *undecanol*), *cetone* (*acetoina*), diverse *hidrocarburi* (*toluen*, *benzen*), *lactone*, *furani*, *compuși cu sulf și cu azot*. Aroma de cacao conține *acid oxalic*, iritant al mucoaselor și provocator de litiază renală.

Multe dintre substanțele aromatizante sunt iritante ale mucoasei gastro-intestinale, solicită ficatul în procesul de detoxifiere, unele fiind cancerigene și mutagene (hidrocarburi).

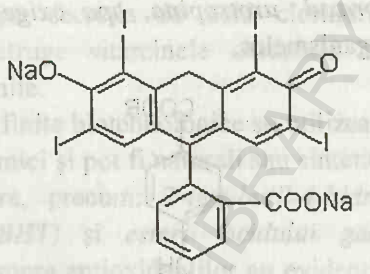
Ca ***potențiatori de aromă*** amintim: *glutamatul monosodic*, *5-nucleotidele* și *maltolul* (2-metil-3-hidroxi-4-pirona). Potențiatorii nu posedă în general gust sau miros specific, dar manifestă efecte sinergice cu aromele propriu-zise.

Astfel, *glutamatul de sodiu* este un ameliorator de gust pentru anumite produse. Acest compus poate exercita un efect toxic asupra sistemului nervos central, în concentrații mai mari de 4 g/zi. Efectele toxice sunt cunoscute sub denumirea de „sindromul restaurantelor chinezești, care se manifestă prin febră și creșterea tensiunii. La sugari, glutamatul de sodiu este strict interzis.

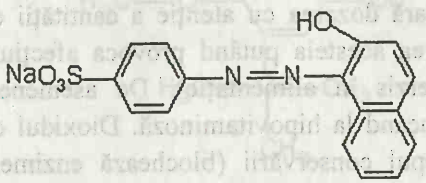
Colorarea produselor biotehnologice (alimentare: băuturi alcoolice și nealcoolice, înghețate, produse de panificație și patiserie, dulciuri, muștar; farmaceutice: siropuri, drajeuri) poate fi realizată în trei moduri: prin folosirea unor materii prime colorate, prin adaosul unor extracte de coloranți naturali (carotenoizi, xantofile, clorofilă, pigmenți antocianici), sau prin adaosul unor coloranți sintetici, care de cele mai multe ori prezintă un anumit grad de toxicitate. ***Coloranții sintetici*** sunt utilizați pe scară largă, din considerente economice. Coloranții admiși în România sunt: *amarantul* (roșu naftol), *eritrozina* (roșie), *tartrazina* (galbenă), *indigotina* (albastru solubil de indigo) și *orange GGN* (galben-portocaliu).



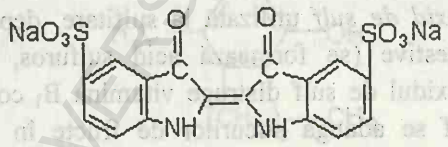
Amarant



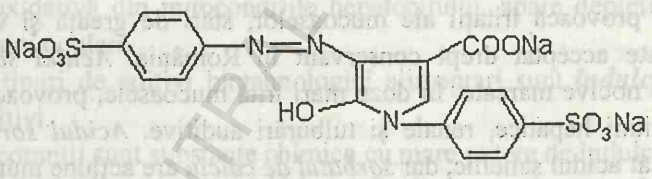
Eritrozina



Orange GGN



Indigotina



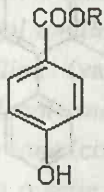
Tartrazina

Amarantul produce hepato- şi splenomegalie, eritrozina provoacă hipertrofie şi hiperfuncţie tiroidiană, tartrazina şi indigotina pot modifica indicii hematologici. Orange GGN este mult mai toxic, provocând anemie, reticulocitoză, modificarea eritrocitelor şi splenomegalie. Nu s-au observat efecte cancerigene ale acestor coloranţi.

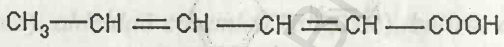
Conservanţii utilizaţi la fabricarea conservelor pot avea acţiuni nefaste în cantităţi mari, asupra organismelor, cu toate că au rolul de a împiedica multiplicarea unei flore nedorite (sunt substanţe antiseptice) şi previn modificările de calitate. Antiseptice precum: *dioxidul de sulf* şi *generatorii de dioxid de sulf* (*sulfit*, *bisulfit*, *metabisulfit*, *pirosulfit*), *acidul benzoic*, *benzoaţii*, *esterii acidului p-hidroxibenzoic*, *acidul salicilic*, *acidul sorbic*, *sorbaţii alcalini*, *acidul propionic*, *propionaţii*, *acidul acetic*, *acetaţii*, *acidul formic*, *formiaţii*, *acidul boric*, *difenilul*,

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

boraxul, *urotropina*, *apa oxigenată*, *clorura de sodiu* pot cauza stări toxice organismelor.



Esteri ai acidului p-hidroxi-benzoic
(R = $-CH_3$, $-C_2H_5$, $-C_3H_7$)

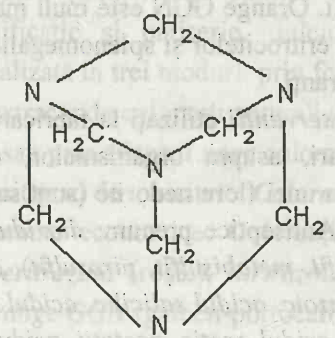


Acid sorbic

În biotehnologia vinului este necesară dozarea cu atenție a cantității de *dioxid de sulf* utilizată la sulfitare, depășirea acesteia putând provoca afecțiuni digestive (se formează acid sulfuros, interzis în alimentație). De asemenea, dioxidul de sulf distruge vitamina B_1 conducând la hipovitaminoză. Dioxidul de sulf se adaugă sucurilor de fructe în scopul conservării (blochează enzimele oxidante precum polifenoloxidazele, peroxidazele, ascorbicoxidaza), dar poate bloca grupările carbonilice ale glucidelor și aldehidelor. Determină dureri de cap, surditate, pierderi în greutate, scăderea numărului eritrocitelor, leucocitelor și altele.

Acizii provoacă iritații ale mucoaselor, stări de greață și vomă. *Acidul benzoic* nu este acceptat drept conservant în România. *Acidul salicilic* poate exercita efecte nocive marcate. În doze mari irită mucoasele, provoacă hemoragie stomacală, leziuni hepatice, renale și tulburări auditive. *Acidul sorbic* este mai puțin toxic decât acidul salicilic, dar *sorbatul de calciu* are acțiune mutagenă.

Difenilul are o puternică acțiune antifungică, fiind utilizat la conservarea fructelor (impregnarea cojilor de citrice în special), dar este toxic și nu trebuie ingerat. *Urotropina* (hexametilentetraamina) are acțiune bactericidă fiind folosită la conservarea icrelor și peștelui. La concentrații mari produce sarcom.

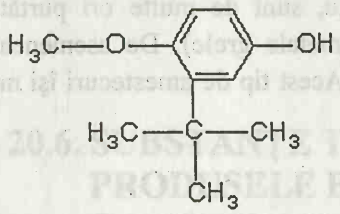


Urotropina
(hexametilentetraamina)

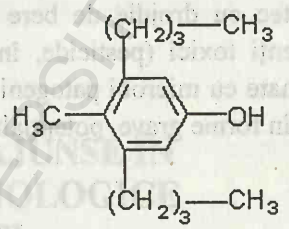
BCU IAȘI / BIBLIOTECA UNIVERSITY LIBRARY

Apa oxigenată irită mucoasele, măreşte secreţia de acid clorhidric, deprimând activitatea enzimelor digestive, distruge vitaminele oxidabile din produsele în care este folosită şi râncezeşte grăsimile.

În vederea prevenirii oxidării produselor finite biotehnologice se utilizează ***antioxidanţi***. Se introduc în alimente în cantităţi mici şi pot fi naturali sau sintetici. În general sunt substanţe puternic reducătoare, precum: *2-terţ-butil-4-hidroxianisolul (BHA)*, *2,6-dibutilhidroxitoluolul (BHT)* şi *esterii acidului galic* (*propilgalat*, *octilgalat*, *dodecilgalat*). Studiile asupra antioxidanţilor au evidenţiat consecinţele toxicologice ale ingerării lor.



2-terţ-butil-4-hidroxianisol (BHA)



2,6-dibutilhidroxitoluol (BHT)

Antioxidanţii provoacă hipertrofie hepatică. În cantităţi mari decuplează fosforilarea oxidativă din mitocondriile hepatocitului, apare depletiţie de vitamina A şi afecţiuni oculare.

Alte tipuri de aditivi biotehnologici alimentari sunt ***îndulcitorii*** (edulcoranţii) nenutritivi.

Edulcoranţii sunt substanţe chimice cu mare putere de îndulcire, utilizaţi ca înlocuitori ai glucidelor. Până în 1960 îndulcitorii aveau ca sursă zahărul extras din trestia de zahăr (şi mai puţin din sfeclă). Din punct de vedere chimic, formulele edulcoranţilor diferă mult de cele ale glucidelor, iar efectul lor metabolic este altul. Edulcoranţii şi-au găsit utilitatea în biotehnologia dulciurilor, băuturilor, sucurilor, fiind recomandaţi bolnavilor de diabet şi obezilor.

Edulcoranţii utilizaţi în Comunitatea Europeană şi SUA sunt: *aspartamul* (Nutra-Sweet), *ciclamaţii*, *taumatina*, *acesulfamul*, *zaharina*, *neohesperidina* şi *sucraloza*. Sintezele acestora pot fi chimice şi/sau enzimatice. Din punct de vedere biotehnologic interesează sintezele fermentative, enzimatice, la care se folosesc enzime extrase din microorganisme.

Aspartamul (esterul metilic al N-L-α-aspartil-L-fenilalaninei) este cunoscut în industrie şi farmacie, fiind utilizat ca edulcorant după 1970. Testele de toxicitate în vederea omologării acestui îndulcitor au durat aproape zece ani.

Taumatinul, un extract proteic obţinut pe cale enzimatică (prin utilizarea lui *Thaumatococcus danielii*) din diferite vegetale, este cel mai dulce produs

cunoscut în prezent. Este utilizat intens în Japonia. În Europa se fac cercetări pentru modificarea genetică a unor microorganisme netoxigene, care să producă acest edulcorant proteic.

Edulcoranții nu prezintă o toxicitate semnificativă, punându-se în schimb problema purificării lor și a riscului de contaminare.

Autolizatele de drojdie de bere (au gust de carne), folosite ca adjuvanți alimentari, pot înlocui hidrolizatele de carne, dar prezintă o anumită toxicitate pentru uremici, datorită conținutului ridicat de nucleotide. ***Făinurile de origine animală*** (făina de pește, de sânge, de carne, de oase, de ou, făinurile din broaște, scoici, melci etc.) utilizate ca adaosuri la diverse produse alimentare sau furajere, în amestec cu drojdie de bere spre exemplu, sunt de multe ori purtătoare de componenți toxici (pesticide, îngrășăminte, metale grele). De asemenea, pot fi contaminate cu microbi patogeni și toxigeni. Acest tip de amestecuri își manifestă deseori, în forme grave, potențialul toxigen.

20.5. ASPECTE TOXICE DETERMINATE DE NERESPECTAREA PARAMETRILOR TEHNOLOGICI

Menționăm că alături de metodele biotehnologice se pot utiliza metode chimice în scopul obținerii aceloraşi compuşi finali. Spre exemplu, procesele de hidroliză pot fi catalizate de *enzime*, dar și de *baze* sau *acizi*. Calea aleasă trebuie să fie cea mai adecvată, respectiv cea mai puțin toxică.

În acest context, în biotehnologia amidonului, la obținerea izosiropului de glucoză, poate fi folosită metoda enzimatică, dar și izomerizarea cu *ciclohexilamină* prin cataliză alcalină. În acest ultim caz, se formează în mediul alcalin existent, compuși secundari nedoriți (glucide nedorite ca manoza, diferiți acizi și compuși colorați), iar metoda nu este indicată în industria alimentară.

Glucozizomeraza, ce transformă glucoza în fructoză (biotehnologia izosiropului de fructoză), necesită *ioni de cobalt* drept cofactor. Adăugarea sărurilor de cobalt în procesul tehnologic este interzisă, datorită toxicității acestui metal greu (cu toate că izosiropul suferă o etapă de demineralizare).

În biotehnologia spirtului, unele preparate enzimatice (amilazice) utilizate la hidroliza amidonului din amidonoase (cereale, cartofi) necesită *ioni de calciu*. Se adaugă în acest sens, var nestins sau hidroxid de calciu. Din punct de vedere toxicologic este necesară respectarea strictă a cantităților adăugate, fără a fi depășite.

Aceleaşi precauţii trebuie luate mai ales în industria farmaceutică, deoarece greşelile tehnologice provoacă impurificarea medicamentelor (creşte potenţialul alergogen), fapt des observat în viaţa de zi cu zi.

Procesele biotehnologice catalizate de enzime necesită respectarea întocmai a parametrilor industriali, precum duratele de reacţie, concentraţiile reactanţilor, *p*H-ul, temperaturile, altfel sunt denaturaţi o serie de compuşi importanţi (descompunerea aminoacizilor, inhibarea activităţii enzimatice, metabolizarea nedorită a glucidelor) şi apar produşi secundari nedoriţi sau toxici.

Nu în ultimul rând, amintim poluarea produsă de ţevile şi instalaţiile învechite, corodate, care lasă să treacă în alimente sau medicamente, ioni metalici toxici.

20.6. SUBSTANŢE TOXICE AJUNSE ÎN PRODUSELE BIOTEHNOLOGICE CA POLUANŢI CHIMICI

O serie de substanţe toxice (îngrăşăminte chimice, pesticide folosite ca erbicide, insecticide, deparazitante, acaricide, fungicide, rodenticide, moluscide, nematocide, metale grele, deşeuri radioactive etc.) se pot găsi în materiile prime utilizate în biotehnologii (datorită tratamentelor aplicate culturilor cerealiere spre exemplu, poluării mediului înconjurător sau datorită unor erori).

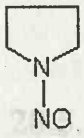
Se ştie că în produsele din carne se introduc anumite cantităţi de ***azotat*** şi ***azotit*** în scopul păstrării culorii roşii a preparatului. Sub influenţa microorganismelor denitrifiante, azotatul trece în azotit, iar sub influenţa reductazelor bacteriene azotitul se transformă la rându-i în oxid de azot.

Azotitul este implicat într-o serie de procese care pot conduce în final la compuşi toxici, după cum urmează: 5–15 % azotit se leagă de mioglobină sau hemoglobină, 5–15 % reacţionează cu grupele tiol ale cisteinei, metioninei, glutationului, formându-se nitrozotioli, 20–30 % reacţionează cu proteine fără hem, 1–5 % atacă glucidele şi lipidele, 1–10 % se retransformă în azotat, iar 5–20 % poate rămâne ca azotit rezidual. Oxidul de azot reacţionează şi el cu hemoglobina (sau mioglobina), rezultând azoxihemoglobină (sau azoximioglobina). Acest compus, se transformă în azoxihemocromogen (sau azoximiocromogen), pigment de culoare roşie, prin sărare, afumare sau fierbere.

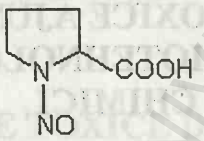
Cantităţile reziduale de azotit şi azotat sunt foarte toxice (se admit maxim 70 mg azotit/kg produs). În general, cantităţile de azotit utilizate pentru înroşire depăşesc acest nivel. De altfel, azotatul se transformă în azotit încă din cavitatea bucală, sub influenţa microbilor, în procesul masticaţiei, şi apoi în intestin. Azotaţii

și azotiții favorizează apariția cancerului de stomac, de vezică urinară, transformă hemoglobina în methemoglobină (formă a pigmentului sangvin ce nu poate transporta oxigen), determinând o stare de hipoxie. Totodată, produsele vegetale, sucurile și conservele pot produce alergii datorită conținutului în azotat (și azotit format din azotat) provenit din sol (utilizat ca îngrășământ).

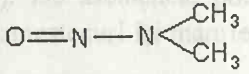
Nitrozoaminele au un potențial cancerigen foarte ridicat și se pot forma în produsele alimentare în timpul tratamentului termic (prăjire, afumare) din aminele biogene și reziduurile de azotit. Au fost identificate aproximativ 100 de nitrozoamine, dar în produsele biotehnologice alimentare se găsesc mai ales nitrozoamine volatile: *N-nitrozopirolidina*, *N-nitrozopiperidina*, *N-nitrozoprolina*, *N-dimetilnitrozoamina*, *N-dietilnitrozoamina*, *N-dipropilnitrozoamina*, *N-dibutilnitrozoamina*.



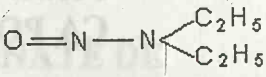
N-nitrozopirolidina



N-nitrozoprolina



N-dimetilnitrozoamina



N-dietilnitrozoamina

S-a demonstrat că o serie de bacterii precum: *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Lactobacillus* și altele pot produce nitrozoamine la *p*H neutru sau alcalin. Nitrozoaminele predomină în produsele de carne și pește, iar condimentele precum piperul și boiaua reprezintă de asemenea o sursă importantă.

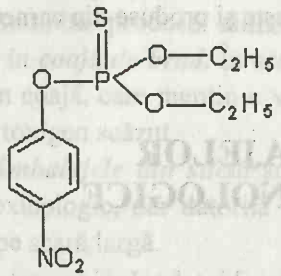
Brânzeturile maturate conțin la rându-le nitrozoamine, formate prin intervenția mucegaiurilor biotehnologice, anume: *Penicillium camemberti* și *Mucor*. În bere (mai ales în berea neagră), nitrozoaminele se formează încă de la obținerea malțului verde (germinarea orzului), pe perioada uscării. Băutura spirtoasă Whisky conține de asemenea nitrozoamine, fiind fabricată din cereale germinate.

Nu numai preparatele alimentare, dar și cele farmaceutice prezintă pericolul formării nitrozoaminelor, în special cele care conțin amine secundare și terțiare (piramidonul, analginul, fenmetrazina se nitrozează în tractul gastrointestinal).

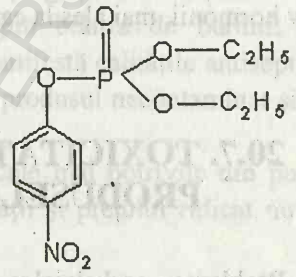
Laptele și automat produsele biotehnologice lactate pot fi impurificate cu *pesticide* (precum: *DDT*, *HCH*, *aldrin*, *malation* etc., provenite din furaje contaminate, de la deratizarea grajdurilor, combaterea ectoparaziților etc.). Pesticidele organoclorurate se dizolvă în țesutul adipos al animalului, din care trec în lapte. Tot prin produsele lactate pot fi preluate diverse medicamente și antibiotice, cu care au

fost tratate animalele. *Ioni metalici* şi *nemetalici toxici* pot fi preluaţi ca lactaţi prin produsele lactate acide. Laptele nu este ferit nici de alcaloizii toxici, preluaţi de erbivore prin ingerarea plantelor toxice (măselariţă, laur, ricin, brânduşe de toamnă). Toate acestea determină tulburări gastro-intestinale, greaţă, vomă, alergii.

Organocloruratele (DDT, HCH, aldrin) irită pielea, mucoasele, produc parestezii, cefalee, comă, convulsii şi chiar moarte în cantităţi mari. Organofosforicele (*malationul*, *parationul* şi derivatul său oxigenat *paraoxonul*) şi *pesticidele carbamice* blochează acetilcolinesteraza, fapt ce determină acumularea acetilcolinei în organism. Ca urmare, se evidenţiază fenomenele clinice tipice intoxicaţiei (tulburări de vedere, hipersecreţie gastrică, transpiraţii, colici, vomă, hipotensiune).



Paration



Paraoxon

Mare parte din pesticidele organoclorurate, organofosforice, organomercurice şi carbamice au fost interzise tocmai datorită toxicităţii lor deosebite.

Produsele biotehnologice provenite din vegetale poartă câteodată reziduuri de ***erbicide*** (în seminţe, tulpini, frunze), care sunt deosebit de toxice. Se cunosc aproximativ 150 de substanţe erbicidante, în practică utilizându-se o gamă mai restrânsă, tocmai datorită toxicităţii. Erbicidele ajunse în ape contaminează peştele şi implicit produsele din biotehnologia peştelui. Erbicidele îşi manifestă toxicitatea încă din timpul pulverizării, deoarece pot pătrunde uşor prin piele, prin mucoase şi prin căile respiratorii ale omului şi animalelor.

O serie de metale (*mercur*, *plumb*, *cadmiu*, *cupru* etc.) şi nemetale (As) cu potenţial toxic contaminează uneori produsele biotehnologice. Toxicitatea lor depinde mult de modul cum se comportă în sucul gastric. Sinergia dintre ele este de asemenea, un element de care trebuie ţinut cont în evaluarea toxicităţii. Prezenţa metalelor în alimente spre exemplu, este direct proporţională cu gradul de poluare al zonelor de unde provin materiile prime şi cu modul de depozitare.

În cereale se găsesc cantități mari de *plumb*, *mercur* și *cadmiu*, care se reduc mult o dată cu decorticarea. Fructele și legumele absorb ioni metalici din solurile poluate, din atmosfera poluată și din instalațiile tehnologice învechite. Se constată că pireurile de mere, pere, și sucurile de fructe conțin *cupru*, *zinc* și *cadmiu*. Metalele grele produc leziuni hepatice, renale, atacă sistemul respirator, sistemul osos, determină apariția dermatitelor, conjunctivitelor etc.

Peștii și moluștele acumulează de asemenea, metale grele toxice, cianuri, pesticide, deșeuri radioactive și altele din apele poluate. Intoxicațiile cu pește sunt deosebit de grave mai ales datorită contaminării microbiene și ptomainelor care se formează.

În consecință, toxicologia alimentelor biotehnologice trebuie să țină cont de toate reziduurile posibile, dintre care amintim: pesticidele, metalele grele, nemetalele, produșii secundari ai metabolismului microbilor, medicamentele, inclusiv hormonii, mai ales la categoriile lactate, pește și produse din carne.

20.7. TOXICITATEA AMBALAJELOR PRODUSELOR BIOTEHNOLOGICE

Problema ambalajelor pentru produsele biotehnologice este foarte importantă, căci un ambalaj necorespunzător depreciază calitativ și toxicologic produsul. Ambalajele pot fi tip folie de plastic, din hârtie, tip folie metalică, din sticlă, din ceramică, din lemn (coajă de copac), tip folie textilă, folii organice (intestine) etc.

Foliile de plastic utilizate pentru ambalarea salamurilor, a untului, a margarinei sunt impregnate cu acid acetic, în scop de conservare (inhibă dezvoltarea microflorei). Acest tip de ambalaje tip folie plastic nu sunt ideale pentru produsele biotehnologice alimentare. Spre exemplu, specialitățile de panificație feliate, salamurile crude și brânzeturile, pot mucegăi în astfel de ambalaje. Prevenirea mucegăirii se realizează prin vidare, dar protecția toxicologică nu este asigurată decât o anumită perioadă (termen de valabilitate). ***Folia organică*** (intestine) este preferabilă, prin faptul că lasă produsul să respire, inhibată fiind astfel sinteza unor compuși toxici de putrefacție (sintetizabili în condiții anaerobe și umezeală).

Ambalajele din hârtie nu pot oferi o protecție deplină, pericolul contaminării microbiologice fiind foarte mare. Deseori, ambalajul din hârtie este dublat cu folie de plastic.

Ambalajele tip folie metalică devin toxice în situația în care produsul ambalat este prea acid, sau prea alcalin (produsele lactate acide solubilizează ionii

metalici sub formă de lactat). Ambalajele din aluminiu au fost incriminate ca fiind factori favorizanți în apariția maladiei Alzheimer (demență senilă), deoarece în creierul bolnavilor s-au găsit acumulări de ioni de aluminiu. Potențial toxice sunt țevile industriale galvanizate sau vasele de cupru, de tablă zincată, de aliaje plumbifere și chiar vasele de lut smălțuite cu oxizi metalici (oxid de plumb).

Deseori, ambalajele metalice, chiar *vopsite și emailate*, devin toxice deoarece pigmenții și emailurile conțin cadmiu. Cutiile de conserve, din tablă cositorită, conțin cantități mari de staniu, toxic la rândul său. Procesul de coroziune și toxicitatea ambalajelor metalice crește și mai mult, dacă produsele conținute sunt carbonatate și colorate cu *coloranți* de tip *azo* (*amarant*, *tartrazină*). Titrul metalelor toxice este cel mai ridicat în produsele concentrate (supe, sucuri).

Se întâmplă ca unele ambalaje metalice să furnizeze ioni metalici care saponifică acizii grași din alimente și provoacă apariția gustului de săpun.

Anumite produse alimentare, spre exemplu brânza de burduf, pot fi ambalate în ***coajă de brad***. În această situație se manifestă calitățile antiseptice ale rășinii din coajă, care mențin o vreme îndelungată produsul necontaminat și cu un potențial toxigen scăzut.

Ambalajele din sticlă sunt în continuare cele mai potrivite din punct de vedere toxicologic, dar datorită formei fixe, greutății și prețului ridicat nu pot fi utilizate pe scară largă.

20.8. PROFILAXIA FENOMENELOR TOXICE ȘI DETOXIFIEREA ÎN ORGANISMELE VII

În ultima vreme s-au aplicat o serie de strategii utile pentru profilaxia și tratamentul alimentar al micotoxicozelor. În acest sens, alimentele și furajele pot conține aditivi speciali, care în concentrații scăzute captează micotoxinele, înainte să fie absorbite din lumenul intestinal. Agenții de captare trebuie să aibă un grad ridicat de specificitate pentru anumite toxine, spre exemplu, toxinele produse de *Fusarium* în furaje.

Cercetările au demonstrat că bentonitele, argilele decolorante, și diverse fibre organice captează micotoxinele. Deficiența înregistrată în acest demers rezidă în faptul că unii dintre agenți, cu o specificitate insuficientă captează de asemenea, microelementele și vitaminele.

Conform ultimelor comunicări ale firmei Altech, captatori puternici ai unei game largi de micotoxine sunt anumiți polimeri carbohidrați (denumire comercială: Mycosorb), respectiv glucomannanii esterificați, extrași enzimatic din peretele celular al drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*.

Organismele au propriile lor sisteme de detoxifiere reprezentate prin reacții biochimice de metabolizare ale compușilor toxici (biotransformare), pe baza asemănării lor structurale cu metaboliți normali, sub influența enzimelor. Biotransformările substanțelor toxice sunt cu atât mai ample, cu cât compusul este mai liposolubil (apolar). Practic, prin aceste transformări, compusul devine din ce în ce mai polar, adică mai hidrosolubil.

Activitatea toxidinamică ce urmează după biotransformări, poate varia în două sensuri:

– în sensul inactivării toxicelor (detoxifiere);

– în sensul bioactivării toxicelor (adică creșterii toxicității, spre exemplu alcaloidul colchicina care se oxidează la oxicolchicină, mai toxică).

Biotransformarea toxicelor poate avea loc fie:

– înainte de trecerea toxicului în sânge sau limfă: spre exemplu, în rumenul erbivorelor microflora metabolizează toxice ca ureea, în intestinul subțire acidul arsenios trece în arseniți, în colon sulful și combinațiile sale organice se transformă în hidrogen sulfurat, în plămâni toxicele se combină cu H_2O sau cu CO_2.

– după trecerea în sânge: toxicele minerale absorbite nu rămân sub formă ionizată, ci se combină cu materiile proteice din plasmă.

Ficatul are cel mai important rol în reacțiile de detoxifiere, deoarece sângele venit din tractul gastrointestinal, care conține substanțele absorbite, traversează mai întâi ficatul și apoi ajunge în circulația generală. Nu există reacții diferite, speciale, de apărare contra substanțelor toxice străine, sau a metaboliților toxici endogeni. Toxicele care ajung prin circulația portală la ficat sunt detoxifiate în funcție de asemănarea lor chimică cu substanțele fiziologice.

Ficatul nu posedă capacitate toxică asupra unor toxice excepționale precum: toxina bacilului botulinic, stricnina, atropina, alcoolul metilic, cocaina. Unele toxice exogene au tendința de a se fixa în ficat, în cantități mari: As, Hg, Pb, P, salvarsanul, morfina, alți alcaloizi.

Biotransformările toxicului pot fi spontane sau provocate. În acest ultim caz, substanța introdusă în scopul de a transforma toxicul într-o substanță neasimilabilă se numește antidot.

Reacțiile de biotransformare metabolică se împart în două categorii importante:

– reacții din faza I: oxidarea, reducerea, hidroliza substanțelor toxice;

– reacții din faza a-II-a: conjugarea substanțelor toxice (glucuronoconjugare, sulfoconjugare, metilare, acetilare, aminoacidconjugare, conjugare mercapturică, conjugare tiocianică), respectiv apariția unui compus, sau a unui metabolit, ce conține atât toxicul, cât și o substanță endogenă, proprie organismului. De obicei, compușii apăruți prin conjugare nu sunt toxici.

În funcție de căile de metabolizare pe care le ia un toxic în organismele unor specii, substanțele toxice își vor manifesta sau nu toxicitatea. În general, biotransformările sunt catalizate de enzime ale metabolismului, deci toxicele suferă conversii pe cale enzimatică.

Spre exemplu, detoxifierea dioxidului de sulf se face prin trecerea acestuia în radical acid sulfat (SO_4^{2-}) cu participarea sulfitoxidazei. Detoxifierea acidului salicilic se face prin conjugare cu un aminoacid, respectiv glicocolul. Acidul saliciluric rezultat se poate elimina cu ușurință (sistemul urinar). Alți acizi organici cu catene liniare (acidul propionic, acidul sorbic etc.) se detoxifică prin eliminare de dioxid de carbon, radicali acetil și energie. Amoniacul format în metabolism beneficiază de intervenția acidului glutamic, care îl transformă în glutamină.

Efectul toxicelor amintite, vehiculate de produsele alimentare biotehnologice, se intensifică mai ales în situația în care în microbiota intestinală crește titrul unor microorganisme patogene (*Escherichia*, *Proteus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Candida*, diverși fungi) în detrimentul florei normale, anume specii de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* și *Bacteroides*. Ingerarea unor produse alimentare alterate produce dezechilibrarea microbiotei intestinale, favorizând cancerul de colon. În această situație se produc în cantități mari compuși toxici pentru organism, precum: fenoli, crezoli, indoli, scatoli (cancerigeni), amoniac, amine secundare și nitrozamine.

Reechilibrarea florei intestinale într-o asemenea circumstanță (precum și în cazul consumului masiv de antibiotice, care provoacă diaree) este necesară și se poate realiza prin administrarea probioticelor (culturi selecționate de bacterii lactice: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus cereus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium longum*) și a unor drojdii (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*). Efectele benefice produse de bacteriile lactice se manifestă prin fenomenul de excludere competitivă a florei patogene.

20.9. IMPACTUL NOILOR PRODUSE BIOTEHNOLOGICE ASUPRA CONSUMATORILOR

Nu în ultimul rând trebuie luate în considerare implicațiile subtile ***geografice***, ***psihologice***, ***sociale*** și ***religioase*** pe care hrana biotehnologică le pune în discuție. Există comunități care consideră că *a consuma microbi* (ne referim la biomasă și la produsele biotehnologice noi, neseparate în final de microorganismele care au produs fermentații) este un fapt nenatural și extrem de nociv.

De asemenea, manipulările genetice prin care au fost introduse gene umane (gena ce codifică biosinteza insulinei) în genomul mamiferelor erbivore (oi, capre) au ridicat probleme religioase, având în vedere că aceste animale au fost introduse ulterior în hrana oamenilor. Totuși, utilizarea animalelor transgenice ca donatori de organe pentru grefele umane, poate fi mai ușor acceptată, având în vedere nenumăratele vieți omenești ce ar putea fi salvate prin această metodă biotehnologică de avangardă.

Alături de valoarea nutrițională și securitatea toxicologică, ***acceptabilitatea*** în circuitul comercial a produselor biotehnologice destinate alimentației a fost una dintre problemele cele mai disputate. Din acest motiv, proteinele biotehnologice spre exemplu, trebuie să aibă o culoare, un gust, un miros și o textură asemănătoare proteinei naturale. Unele produse proteice fungice *Quorn Protein*, care se vând ca proteine vegetale, au textură de carne și au fost deja acceptate în alimentația umană.

Din sondajele statistice, realizate de marile firme producătoare de produse biotehnologice destinate alimentației, se constată că acceptabilitatea acestora depinde, de asemenea, de substraturile utilizate ca surse nutritive pentru microorganisme, dar și de costurile la care se ridică, comparativ cu proteina animală. Consumatorii acceptă cu greu ideea că unele produse biotehnologice alimentare sau medicamentoase provin prin metabolizarea unor deșeuri.

La sfârșitul acestui capitol ne exprimăm convingerea că secolul al XXI-lea va fi secolul biotehnologiei (ca știință și ca tehnică). Statele care vor încuraja investițiile și care vor obține rezultate în domeniul biotehnologiei se vor situa în frunte, deoarece produsele obținute pe această cale sunt competitive ca preț și calitate.

Un studiu amănunțit al principalelor state europene (Anglia, Germania, Franța), americane (S.U.A.) și asiatice (Japonia) poate să ne indice calea pe care trebuie să o urmăm. Menționăm că S.U.A. a abordat calea de dezvoltare a biotehnologiei prin facilitarea proliferării firmelor mici și mijlocii de profil, pe când statele din Europa au dezvoltat firmele mari și concernele de biotehnologie.

România trebuie să dezvolte învățământul superior biotehnologic și să încurajeze activitatea firmelor mici și mijlocii cu profil adecvat.

21. DEGRADAREA MICROBIANĂ A MATERIALELOR

21.1. INTRODUCERE

Microorganismele joacă un rol important în biosferă, asigurând descompunerea materiei organice şi reciclarea nutrienţilor. De asemenea, au un rol negativ prin degradarea unei game largi de materiale, în care includem: minerale anorganice, roci, metale precum şi polimeri naturali sau artificiali.

În condiţii naturale, coroziunea metalelor şi aliajelor este rezultatul proceselor electrochimice şi biologice ce se desfăşoară pe suprafeţe sau în imediata vecinătate a acestora, procese iniţiate de microbacterii.

Degradarea materialelor se datorează exoenzimelor secretate de bacterii, urmată de deteriorarea fizică a acestora.

Totalitatea proceselor de degradare a materialelor influenţate sau induse de microorganisme poartă numele de *coroziune indusă pe cale microbiană* (CIM).

Adeziunea şi stabilitatea unei comunităţi complexe de microorganisme cu formarea biofilmelor pe suprafaţa materialelor reprezintă condiţia preliminară absolut necesară pentru coroziunea microbiologică.

Deoarece toate suprafeţele materialelor acţionează în calitate de substrat pentru formarea acestor biofilme, atacul materialului de către microorganisme se produce fie direct, fie indirect, depinzând de o combinaţie de factori, care pot fi: compoziţia materialului, natura suprafeţei, microflora indigenă. De asemenea, alţi câţiva factori asigură aderenţa coloniilor de microorganisme la suprafaţa materialelor. Dintre acestea menţionăm: tăria ionică a soluţiei, tipul de cationi, forţa hidrodinamică şi proprietăţile de suprafaţă (hidrofobicitatea, hidrofilicitatea).

Degradarea microbiană a polimerilor naturali sau artificiali este mediată de anumite enzime numite *depolimeraze extracelulare*, întrucât dimensiunea moleculară a polimerilor este prea mare pentru a pătrunde prin membrana celulei

bacteriene în citoplasmă. Produșii de degradare, de dimensiuni reduse, pot fi astfel asimilați de către bacterii și utilizați ca sursă de carbon și energie.

Procesul prin care materialele sunt descompuse și alterate structural se numește *degradare*, sau deteriorare, și poate merge până la mineralizare, adică o degradare completă a polimerilor până la compuși anorganici simpli ca CO_2 și H_2O, în condiții aerobe, și până la CH_4, H_2S, CO_2 și H_2O, în condiții anaerobe.

21.2. EVOLUȚIA ȘI DIVERSITATEA MICROORGANISMELOR

Cele mai primitive forme de viață sunt *procariotele*. Mutațiile, recombinarea genetică, cuplate cu selecția naturală au condus la o diversitate enormă a acestora. Descifrând codul genetic în genomul bacterial s-a constatat că pentru bacterii este specific ARN-ul ribozomal 16S și 18S, rezultând o mare diversitate biologică și fiziologică. Ținând cont de marea lor diversitate, bacteriile pot fi clasificate pe baza necesităților de hrană; de exemplu, ele au nevoie de anumite elemente ca sulf, azot, fosfor și, de asemenea, de sursa de carbon și electroni (energie). În funcție de sursa de carbon, bacteriile se clasifică în: *autotrofe* (au ca sursă de hrana CO_2) și *heterotrofe* (au ca sursă carbonul redus ca, de exemplu, glucoza).

Bacteriile se caracterizează și printr-o mare diversitate ecologică, fiind răspândite practic în toate mediile, chiar și în unele cu proprietăți unice, cum ar fi: izvoarele fierbinți, habitate sulfatreducătoare sau metanogene.

Prin tehnica actuală, microbiologia nu a putut identifica mai mult de 1% din populația microbiană a Terrei. Inabilitatea omului de a crea culturi de laborator pentru cele mai numeroase microorganisme arată completa necunoaștere a relațiilor dintre microflora habitatelor naturale și necesitățile lor nutriționale.

Necunoașterea proprietăților fiziologice și biochimice ale microorganismelor este o barieră în studiul coroziunii microbiologice.

21.3. BIOFILME MICROBIENE

Biofilmele microbiene sunt o colecție de celule bacteriene, sau de agregate de celule, menținute pe suprafața materialelor prin forțe electrostatice și/sau prin exopolimeri aderenți. Formarea biofilmelor pe suprafață este rezultatul contactului

dintre bacterii şi suprafaţa substratului prin forţe de mică distanţă. Coliziunea iniţială are loc datorită flagelilor bacteriilor, mişcării browniene a acestora sau forţelor hidrodinamice. Astfel, o parte dintre bacterii rămân pe suprafaţă şi încep să producă (sintetizeze) materiale exopolimerice. Cercetări recente au arătat că există molecule semnalizatoare „de la celulă la celulă" care controlează densitatea bacteriilor pe suprafaţă în mediul de creştere şi care comandă şi sinteza exopolimerului atunci când densitatea celulelor atinge o anumită valoare. Exopolimerul este mediul ce ţine lipită colonia de bacterii de suprafaţă. Semnalul „de la celulă la celulă" este un factor cheie în dezvoltarea biofilmelor. În laborator s-a constatat că moleculele de N-Acil monoserin lactoză sunt implicate în procesul de semnalizare „de la celulă la celulă".

După etapa iniţială de lipire la suprafaţă (fig. 21.1) începe procesul de reproducere şi de creştere a coloniei. Când filmul atinge o anumită grosime, o parte se desprinde de pe suprafaţă şi poate forma alte colonii la distanţă.

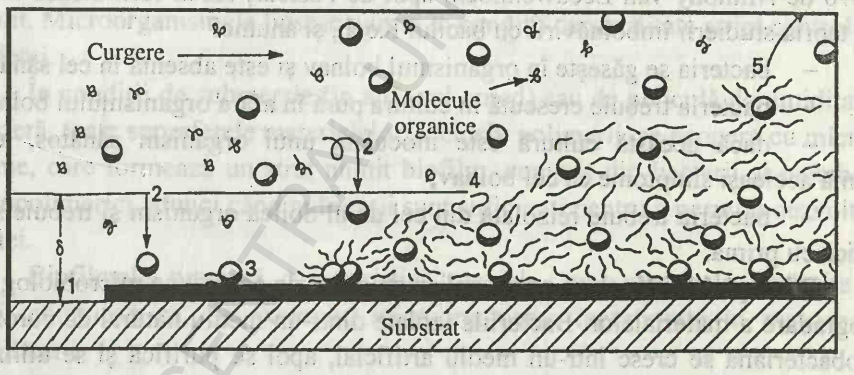


Fig. 21.1. Etapele formării biofilmului: *1* – adsorbţia moleculelor organice pe suprafaţă; *2* – adsorbţia microorganismelor pe suprafaţă; *3* – formarea exopolimerilor prin consumul substanţelor organice; *4* – detaşarea formaţiunilor microorganism–exopolimer datorită curenţilor de apă; *5* – stabilizarea grosimii δ de echilibru a stratului.

Factorii fizico-chimici ce influenţează formarea biofilmelor sunt: tăria ionică, tipul de cation (sarcină), concentraţia cationilor, prezenţa surfactanţilor şi caracteristicile de suprafaţă ale substratului, hidrofobicitatea uşurând formarea biofilmelor. Cationii cu sarcina mare micşorează grosimea stratului dublu electric şi uşurează fixarea bacteriilor.

21.3.1. Influența biofilmelor asupra funcționalității sistemelor tehnologice nebiologice

Principalele efecte pe care le poate avea un biofilm într-un sistem tehnologic sunt:

- *Biofouling*-ul – reprezintă creșterea excesivă a stratului de microorganisme în care sunt incluse și alte tipuri de depozite biologice, minerale corozive etc.;
- *Rezistența la transfer termic.* Datorită *biofouling*-ului, transferul termic în interiorul instalațiilor este mult redus;
- *Astuparea conductelor și a mediilor poroase* cu biomasa microbiană;
- *Coroziunea metalelor și degradarea polimerilor*;
- *Rezistența la biocizi* – biofilmul protejează bacteriile de acțiunea biocizilor, constituind un ecran de protecție pentru acestea.

Postulatul lui Koch. Continuând observațiile asupra bacteriilor, începute în 1676 de Anthony van Leeuwenhoek, apoi de Pasteur, Koch formulează în anul 1884 teoria studierii îmbolnăvirii cu bacilul Koch, și anume:

- bacteria se găsește în organismul bolnav și este absentă în cel sănătos;
- bacteria trebuie crescută în cultura pură în afara organismului bolnav;
- dacă această cultură este inoculată unui organism sănătos, acesta prezintă aceleași simptome ca cel bolnav;
- bacteria trebuie reizolată din cel de-al doilea organism și trebuie să fie identică cu prima.

Principiul lui Koch se poate aplica studiilor de coroziune microbiologică și de degradare a materialelor. Bacteriile izolate dintr-un mediu natural de coroziune microbacteriană se cresc într-un mediu artificial, apoi se purifică și se utilizează pentru studiul coroziunii în condiții de laborator. Dacă forma de coroziune este similară cu cea din mediul natural, atunci coroziunea este microbiologică.

21.4. DEGRADAREA MICROBIOLOGICĂ A MASELOR PLASTICE (POLIMERI ARTIFICIALI) ȘI A POLIMERILOR NATURALI (BIOPOLIMERI)

Materialele polimerice sunt foarte diferite atât în ceea ce privește compoziția chimică, cât și ca formă fizică (profile solide, spume solide, materiale poroase, peliculogene etc.), ca proprietăți mecanice și ca aplicații practice.

Variațiile structurale se datorează tipului de legătură C–C și a orientării acesteia în spațiu. Aplicațiile practice ale polimerilor includ domenii foarte variate ca, de exemplu: ambalaje, componente structurale, materiale izolante termic, materiale izolante fonic, straturi de acoperire, implanturi medicale, purtători pentru medicamente, izolatori electrici, semiconductori și conductori electrici, componente de telecomunicații, componente din industria aero-spațială, din industria electronică și de calculatoare, echipamente sportive, consolidanți în industria construcțiilor civile etc.

În serviciu, masele plastice sunt supuse acțiunii diverșilor factori de mediu, inclusiv contaminarea cu microorganisme, fapt care duce la „îmbătrânirea" în timp și deci degradarea sau dezintegrarea lor.

Materialele polimerice sunt expuse în diverse medii naturale: aer, apă, sol, chiar și în spațiul cosmic, precum și în medii artificiale (puternic acide sau alcaline). De asemenea, sunt expuse în fluidele vii sub formă de implanturi. În toate aceste medii ele pot fi supuse atacului microbacteriilor fie în condiții de aerobie, fie în condiții de anaerobie (*oxic* și *anoxic*).

În toate aceste medii contactul dintre microorganisme și suprafața materialului este de neînlăturat, contaminarea mediului ambiant cu bacterii fiind un fapt obișnuit. Microorganismele lipsesc numai în condiții de sterilitate strict controlată a suprafeței.

În condiții de submersie (în apă, sol umed) sau de peliculă de umiditate în atmosferă, toate suprafețele materialelor, inclusiv polimerii, se acoperă cu microorganisme, care formează un strat numit biofilm, compus din bacterii și metaboliții lor exopolimerici, atunci când nutrienții sunt suficienți pentru a permite dezvoltarea coloniei.

Biofilmele prezintă caracteristici speciale, mai ales cele alcătuite din colonii complexe ca, de exemplu, microorganisme încorporate în matricea de exopolimeri.

Cele mai importante caracteristici sunt reprezentate de procesele de aerobie și anaerobie care au loc concomitent în spațiu și timp.

21.4.1. Mecanismul degradării

Formarea biofilmului este prima treaptă obligatorie pentru desfășurarea procesului de degradare a polimerului. În biofilmele formate există, de obicei, mai multe grupe de microorganisme aerobe, microorganisme facultative, microorganisme anaerobe, toate lucrând în mod sinergetic în procesul de distrugere a polimerului. Aceste asociații de microbacterii diferite, lucrând sinergetic, se numesc consorții care pot ataca o varietate foarte mare de substraturi.

Teoria generală a degradării polimerilor arată că exoenzimele microorganismelor descompun (rup) catena macromoleculei în unități mai mici (oligomeri,

dimeri, monomeri) care astfel pot penetra membrana celulei și, în mod subsecvent, pot fi asimilați ca sursă de carbon și energie (fig. 21.2).

Procesul se numește *depolimerizare*, când se formează oligomeri, dimeri și monomeri, și *mineralizare*, când se formează CO_2, H_2O, CH_4.

Niciodată nu există mineralizare completă pentru polimerii biodegradabili deoarece o parte din carbon este folosită la formarea biomasei bacteriilor.

În condiții diferite, grupele de microorganisme diferă și ele, astfel că și degradarea se va produce pe căi variate (ca în schema din figura 21.2).

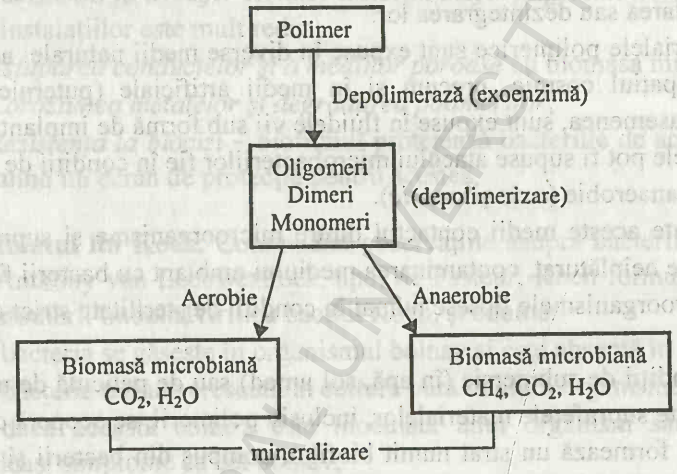


Fig. 21.2. Schema degradării materialelor polimerice.

Microorganismele degradează o mare varietate de polimeri depinzând de compoziția și greutatea moleculară. Unii polimeri, mai ales cei naturali (celuloza, chitina, polihidroxibutiratii (PHB)) sunt rapid degradați, pe când alții, în special cei artificiali, sunt mai greu și mai lent degradabili – aici includem polieteri, poliesteri, poliuretani, poliimide, straturi organice de protecție (vopsele anticorozive), compozite cu fibre de armare, polipropilenă, polietilenă etc.

Polimerii pot fi clasificați după biodegradabilitate în:

1) relativ degradabili;
2) recalcitranți;
3) complet nedegradabili – cei artificiali tridimensionali.

Biodegradarea se poate produce pe cale:

a) aerobă (în prezența O_2). Bacterii ca *Pseudomonas lemoigneis* și *Alcaligenes faecalis* sunt capabile să depolimerizeze (degradeze) prin activitatea aerobă a depolimerazei;

b) pe cale anaerobă: *Desulvovibrio desulfuricans*, *Methanobacteris*, *Methanococcus* etc.

Biocizii. Pentru reducerea activității de degradare a polimerilor și a altor substanțe ca uleiuri etc. se folosesc substanțe variate denumite biocizi. Acești biocizi împiedică formarea biofilmelor pe suprafața substraturilor.

Biodegradabilitatea și sănătatea. Implanturile pot fi și ele atacate de microorganisme. Metaboliții acestora pot fi toxici sau alergici în zona implantului.

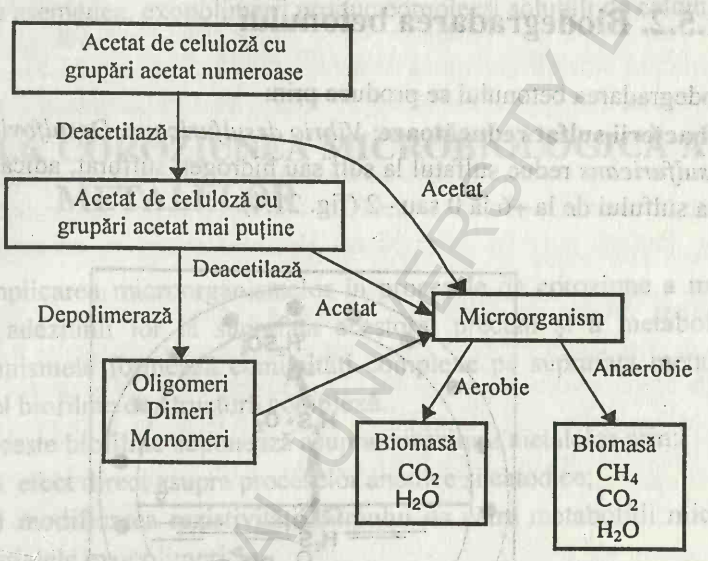


Fig. 21.3. Descompunerea microbiologică a acetatului de celuloză.

21.5. BIODEGRADAREA MATERIALELOR CERAMICE

21.5.1. Biodegradarea sticlei

În contact cu bacteriile sticla prezintă o coroziune mărită. Există bacteria silicatică definită ca bacteria chemolito-autotrofă care își ia energia prin deteriorarea legăturii Si–O din silicați. Unele microorganisme atacă sticla optică formând geluri prin reacții de complexare. Majoritatea microorganismelor care provoacă creșterea *p*H-ului mediului duc la coroziunea sticlelor. Fiind știut faptul că materialele ceramice pe bază de SiO_2 sunt sensibile în medii alcaline, instabilitatea acestora a fost pusă pe seama a două mari mecanisme: schimb ionic între ionii alcalini din compoziția sticlei cu ionii de hidrogen – proces controlat de difuziune –, urmat de dizolvarea matricei. În urma primei etape de dizolvare, pe

suprafață se formează un strat superficial sub formă de gel. Difuzia prin acest strat de gel devine etapa determinantă de reacție. Dizolvarea matricei silicatice este consecința ruperii legăturilor Si–O–Su de către ionii OH^-, formând radicali O^- care reacționează cu moleculele de apă generând noi ioni hidroxili OH^-, ceea ce duce la o creștere excesivă a *p*H-lui.

21.5.2. Biodegradarea betonului

Biodegradarea betonului se produce prin:

- **bacterii sulfat reducătoare**: *Vibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio Desulfuricans* reduc sulfatul la sulf sau hidrogen sulfurat, adică scad starea de oxidare a sulfului de la +6 la 0 sau –2 (fig. 21.4).

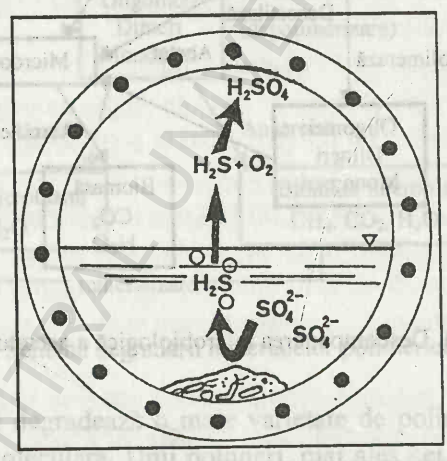


Fig. 21.4. Diagrama schematică a coroziunii betonului în prezența bacteriilor sulfat reducătoare.

- **bacterii de oxidare a sulfului** (*Thiobaccilus thiooxydans*), care sunt capabile să obțină energia de creștere prin oxidarea sulfului de la starea de oxidare –2 (H_2S) sau 0 (S) la +6 (SO_4), conform reacțiilor:

$$2H_2S + O_2 \rightarrow S_2 + 2H_2O + 80\ Kcal \qquad (21.1)$$

$$S_2 + 3O_2 + 2H_2O \rightarrow 2H_2SO_4 + 240\ Kcal \qquad (21.2)$$

- **bacterii nitric oxidante.** Bacteriile nitric oxidante sunt chemoautotrofe, adică obțin carbonul din CO_2 sau carbonați, iar energia prin oxidarea ionilor NH_4^+ sau NO_2^-, conform reacțiilor:

$$NH_4^+ + 1{,}5O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O + 2H + 76\ Kcal \quad (21.3)$$

$$NO_2^- + 0{,}5O_2 \rightarrow NO_3^- + 24\ Kcal \quad (21.4)$$

Prin acest mecanism, ca urmare a producerii acidului azotic, bacteriile nitrifiante joacă un rol important în degradarea betonului prin formarea azotatului de calciu.

De asemenea, exopolimerii produc complecşi solubili de calciu.

21.6. COROZIUNEA MICROBIOLOGICĂ A METALELOR

Implicarea microorganismelor în procesele de coroziune a metalelor este rezultatul adeziunii lor la suprafaţa acestora, precum şi a metabolismului lor. Microorganismele formează comunităţi complexe pe suprafaţa metalelor şi dezvoltă astfel biofilme de structură complexă.

Aceste biofilme acţionează asupra coroziunii metalelor prin:

1) efect direct asupra proceselor anodice şi catodice;

2) modificarea rezistivităţii filmului de către metaboliţii microbiali şi de către materialele exopolimerice;

3) generarea unor micromedii care promovează coroziunea, de exemplu crearea de micromedii cu oxigenare scăzută sau cu compoziţie acidă;

4) formarea de celule (pile) electrochimice de concentraţie.

Deoarece biofilmele sunt prezente într-o mare diversitate de medii, influenţa lor asupra materialelor metalice se manifestă într-un domeniu larg de: temperatură, umiditate, salinitate, aciditate, alcalinitate şi condiţii barometrice.

Există o gamă variată de microbacterii care, din punct de vedere al coroziunii, pot acţiona: în condiţii *oxice* (în prezenţa oxigenului) – microorganisme aerobe – şi în condiţii *anoxice* (în lipsa oxigenului) – microorganisme anaerobe – precum şi microorganisme care pot acţiona simultan în condiţii oxice şi anoxice.

21.6.1. Coroziunea aerobă

În condiţii aerobe, oxigenul molecular (O_2) serveşte ca acceptor de electroni pentru a asigura un maxim de energie necesar creşterii microbiene.

În felul acesta microorganismele formează zone pe suprafața metalului în care se induce, prin consumul local de oxigen, formarea celulelor de aerație diferențială. Astfel, după adeziunea inițială prin atracție electrostatică, microorganismele se multiplică și formează colonii care consumă oxigenul și eliberează ioni de hidrogen (H^+).

Astfel, în condiții de aerobie zona (suprafața) metalică de sub aceste colonii va acționa ca anod (zonă anodică) deoarece oxigenul din această zonă este consumat de colonie, iar zonele mai îndepărtate de colonie, în care oxigenul este în concentrație mai mare, vor funcționa drept catod (sau zonă catodică). În felul acesta se formează o celulă galvanică de aerație diferențiată (fig. 21.5).

Din figura 21.5 se observă că electronii (e^-) se deplasează de la zona anodică spre zona catodică, inițiind procesul de coroziune. Electroliții afectează distanța dintre anod și catod, distanță care este mai mică, la concentrații mai mici, sau mai mare la concentrații mari. Astfel, se creează o diferență de potențial între aceste zone făcând posibilă coroziunea electrochimică în celula de aerație diferențială.

În acest proces de coroziune aerobă a oțelului, produșii de coroziune formează în mod obișnuit structuri care constau din straturi denumite tuberculi. Un strat intern de culoare verzuie constă din hidroxid feros $Fe(OH)_2$; stratul exterior de culoare galben orange constă din hidroxid feric $Fe(OH)_3$; iar între ele se formează un strat de culoare neagră de magnetită (Fe_3O_4).

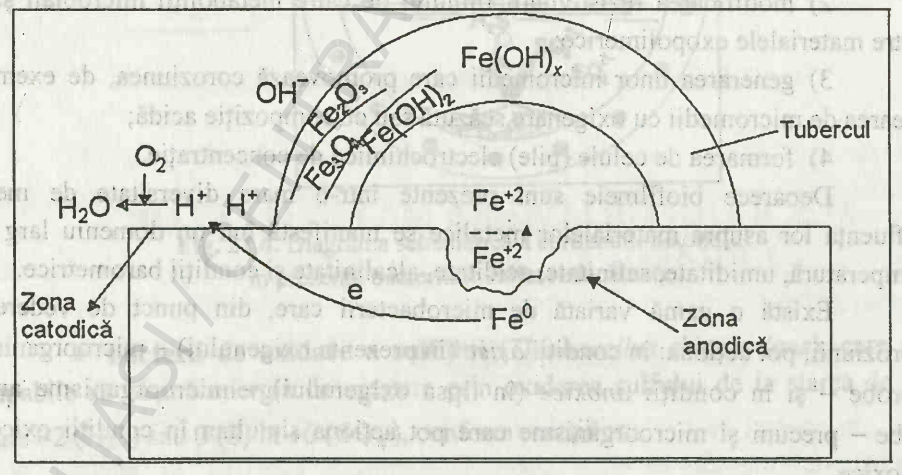


Fig. 21.5. Formarea tuberculilor ca urmare a coroziunii microbiologice a oțelului carbon.

Reacțiile anodice și catodice din celula de aerație diferențială care produce coroziunea cu formare de tuberculi sunt descrise ca reacții de transfer de sarcină astfel:

$$Fe^0 \rightarrow Fe^{++} + 2e \quad \text{zona anodică} \quad (21.4 \text{ bis})$$

$$O_2 + 2H_2O + 4e \rightarrow 4OH^- \quad \text{zona catodică} \quad (21.5)$$

$$2Fe^{2+} + 0{,}5O_2 + 5H_2O \rightarrow 2Fe(OH)_3 + 4H^+ \text{ (tubercul)} \quad (21.6)$$

Oxidarea inițială a fierului ($Fe^+ \rightarrow Fe^{++} + 2e^-$) la *p*H neutru este controlată de oxigenul dizolvat ($O_2 + 2H_2O + 4e \rightarrow 4OH^-$). Oxidarea următoare a $Fe^{++} \xrightarrow[-e]{} Fe^{+++}$ este un proces producător de energie, care este controlat de microorganisme. Energia liberă a acestui proces este redusă (~ 31 kJ), astfel încât cantități mari de ioni Fe^{++} sunt consumate pentru a asigura creşterea coloniei de bacterii.

Microorganismele implicate în procesul de coroziune aerobă. Există mai multe grupe de microorganisme aerobe implicate în procesul de coroziune. Astfel distingem:

Bacterii de fier. Sunt bacterii care conțin în peretele celular fier. Menționăm câteva dintre aceste bacterii: *Gallionela ferruginea*, *Leptothrix*, *Siderocapsa*, *Naumaniella*, *Sideococcus*, *Pedomicrobium*, *Seliberia*, *Acirutobacter* etc.

În prezența acestora, ioniul Fe^{++} la *p*H neutru şi în prezența O_2 este rapid transformat în ion Fe^{+++}.

Microorganisme ca, de exemplu, *Thiobaccillus* sunt, de asemenea, răspunzătoare de coroziunea oxidativă a fierului. Metabolic, ele oxidează sulful la acid sulfuric, care poate ataca metalele.

Cele mai multe microorganisme înglobează Fe^{+++} în suprafața lor externă, reacționând cu materialele exopolimerice. Asemenea mecanisme au implicații multiple în coroziunea sau în acumularea de metale grele în habitate naturale. Astfel, *Aquaspirillum magnetotacticum* este capabilă să complexeze Fe^{+++} şi să îl transforme în magnetită (Fe_3O_4) prin reducere şi oxidare parțială.

21.6.2. Coroziunea anaerobă

În absența oxigenului, bacteriile anaerobe, inclusiv cele metanogene, sulfat reducătoare, acetogene etc., sunt implicate activ în procesul de coroziune anaerobă.

Bacteriile suflat reducătoare sunt printre grupurile cele mai intens studiate din punct de vedere al coroziunii microbiologice.

În condiții de anaerobie nu există oxigen ca acceptor de electroni. În schimb, pot fi folosiți în acest scop alți ioni ca, de exemplu, ionul sulfat SO_4^{2-}.

Fiecare ion acceptor de electroni este unic în ceea ce privește mecanismul metabolic. În procesul de coroziune microbiologică au loc următoarele reacții:

$$4Fe^0 \rightarrow 4Fe^{2+} + 8e \qquad \text{reacția anodică} \qquad (21.7)$$

$$8H_2O \rightarrow 8H^+ + 8OH^- \qquad \text{disocierea apei} \qquad (21.8)$$

$$8H^+ + 8e \rightarrow 8H \text{ adsorbit} \qquad \text{reacție catodică} \qquad (21.9)$$

$$SO_4^{2-} + 8H \rightarrow S^{2-} + 4H_2O \qquad \text{consum bacterial} \qquad (21.10)$$

$$\mathbf{Fe^{2+} + S^{2-} \rightarrow FeS} \qquad \textbf{produs de coroziune}$$

$$4Fe + SO_4^{2-} + 4H_2O \rightarrow 3Fe(OH)_2 \downarrow + FeS \downarrow + 2OH^- \qquad (21.11)$$

Procesul de coroziune anaerobă în prezența bacteriilor sulfat reducătoare este descris în figura 21.6.

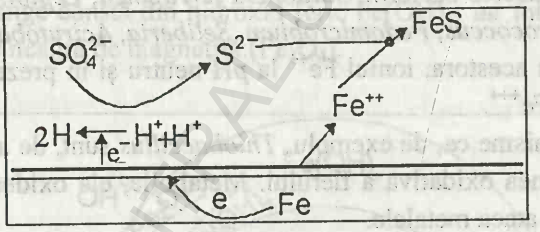


Fig. 21.6. Coroziunea anaerobă a oțelului carbon în prezența bacteriilor sulfat reducătoare.

În procesul de coroziune descris mai sus, potențialul de electrod este de −52 mV/enh. În laborator s-a demonstrat că atunci când se inoculează bacterii sulfat reducătoare, potențialul variază brusc spre valori anodice cu 50 mV.

Înainte de inoculare, valoarea potențialului este dată de concentrația ionilor de hidrogen, care formează un film de hidrogen adsorbit (H) pe suprafața metalului, film care conduce la polarizarea electrodului.

Imediat după inoculare se produce depolarizarea electrodului, fapt observat prin creșterea bruscă a potențialului cu 50 mV.

Acest proces se datorează activității bacteriilor sulfat reducătoare care prin enzima hidrogenază consumă hidrogenul adsorbit, producând depolarizarea bruscă.

Această îndepărtare (sau consum) de electroni ca rezultat al utilizării hidrogenului în procesul de depolarizare forțează trecerea în soluție a fierului ca un proces continuu.

Enzima hidrogenază, sintetizată de numeroase bacterii din specia *desulfovibrio*, este implicată în acest proces specific de depolarizare, intervenind astfel direct în procesul de coroziune anaerobă; astfel, în condiții anaerobe, ionul SO_4^{2-} în soluție apoasă este redus microbiologic în ion S^{2-}. Acest produs biogenic S^{2-} reacționează în continuare cu Fe^{2+} și formează precipitatul de FeS.

Ca rezultat al reacțiilor electrochimice catodul este progresiv înconjurat de mediu alcalin datorită prezenței ionului OH^- în exces, ioni care la rândul lor vor reacționa cu Fe^{++} formând precipitatul de $Fe(OH)_2$.

Sulfura biogenică FeS se poate transforma în minerale de tip makinavită, pirotită, marcasită, pirită.

Bacterii sulfat reducătoare. În mod obișnuit sunt cunoscute 18 specii de bacterii sulfat reducătoare, dintre care menționăm: *desulfovibrio*, *desulfomonas*, *desulfoternaculum*, *desulfobulbus*. Acestea folosesc lactații, piruvații și etanolul ca sursă de carbon și energie pentru a reduce sulfatul la sulfură. Alt grup de bacterii folosesc acizii grași și acetații ca sursă de carbon și energie pentru a reduce sulfații la sulfuri. Dintre aceste bacterii menționăm: *desulfobacter*, *desulfococcus*, *desulfonema*.

De subliniat că, în mod obișnuit, condițiile oxice și anoxice coexistă, astfel că procesul de coroziune microbiologică se produce în mod complex și simultan în prezența bacteriilor aerobe și anaerobe. Mecanismul acestui proces este puțin cunoscut.

Bacteriile produc mari cantități de biopolimeri (exopolimeri). Exopolimerii cu caracter acid conțin grupări funcționale acide care le permit să reacționeze cu metalele, formând complecși solubili care, în acest fel, produc dizolvarea (coroziunea) substraturilor metalice.

Se cunosc exemple de coroziune severă produsă astfel. Este cunoscut cazul conductelor de cupru folosite în sistemele de transport al apei.

Fragilizarea prin hidrogen. În timpul dezvoltării coloniilor de bacterii, procesele de fermentație produc acizi organici și hidrogen molecular. Acest hidrogen poate fi adsorbit inițial ca hidrogen atomic pe suprafața instalațiilor de fermentație.

Prin permearea în metal a H atomic microbian se poate produce fragilizarea materialului, dacă acesta este susceptibil la această formă de atac.

Coroziunea prin fungi. Fungii produc metaboliți corozivi mai ales sub forma unor acizi organici care pot coroda puternic metalele.

21.7. NOȚIUNI DE TERMODINAMICA COROZIUNII MICROBIOLOGICE

Metalele și aliajele se corodează, iar bacteriile se dezvoltă printr-un mecanism redox cunoscut. Este demn de remarcat faptul că, dacă natura electrochimică a proceselor de coroziune este demult stabilită și acceptată de inginerii corozioniști, nu același lucru se poate spune despre acceptarea faptului că reacțiile elctrochimice redox stau la baza funcționării membranelor biologice, inclusiv a celor mitocondriale și celulare ale bacteriilor.

Acest fapt a fost pus în evidență de bioelectrochimie, disciplina care are ca scop principal studiul fenomenelor electrochimice ce au loc în membranele biologice. Ca urmare a acestor studii s-a stabilit faptul că fiecare bacterie ocupă zone de creștere restrictivă în diagramele potențial *p*H de tip Pourbaix, iar acest lucru atestă faptul că dezvoltarea bacteriană este guvernată de mecanisme electrochimice.

În timpul creșterii, bacteria catalizează numeroase reacții electrochimice lente, folosind pentru metabolism și dezvoltare energia debitată de pila electrochimică. Produșii reacțiilor metabolice pot fi corozivi sau pot dizolva filmele pasive de pe suprafața metalelor și aliajelor.

Vitezele de reacție microbiene sunt limitate de factori de mediu, dar sunt suficient de rapide pentru a produce o coroziune microbiană rapidă în condiții naturale în care, în mod normal, nu ar fi de așteptat o coroziune semnificativă. Astfel, sub biofilmele formate și sub produșii generați de coroziune pot să apară în sisteme industriale cu apă recirculată micromedii anaerobe ocluse de natură acidă, alături de celule de concentrație (zone în care concentrația unui anumit element, de regulă oxigenul, este diferită), care pot accelera semnificativ coroziunea, inclusiv printr-un mecanism de crevasă.

Pentru a ușura înțelegerea mecanismului coroziunii microbiene, în acord cu Jones, se vor corela datele termodinamice caracteristice coroziunii cu cele caracteristice creșterii microbiene, într-o structură electrochimică familiară în știința coroziunii.

21.7.1. Coroziunea electrochimică a oţelului

Coroziunea electrochimică reprezintă distrugerea metalelor în prezenţa soluţiilor de electroliţi, ca urmare a funcţionării micropilelor locale de coroziune, formate din mai mulţi anozi şi un singur catod – stabilite statistic pe suprafaţa metalului. Anozii acestor micropile sunt zone extrem de mici ca suprafaţă, polarizate – din diverse cauze – anodic, în care metalul se dizolvă, iar catodul este reprezentat de restul suprafeţei metalice, care este de câteva ordine de mărime mai mare ca suprafaţa anozilor şi pe care au loc **reacţiile de depolarizare catodică** a diverşilor oxidanţi prezenţi în mediu.

Aceşti oxidanţi pot fi:

- *Ionii de hidrogen*, în medii acide neaerate:

$$2H^+ + 2e^- = H_2, \qquad (21.12)$$

reacţia fiind caracterizată de un potenţial electrochimic de echilibru, exprimat în V:

$$\varepsilon_{H^+/H_2} = 0{,}000 - 0{,}0591\,pH.$$

- *Oxigenul*, în soluţii aerate:

$$O_2 + 2H_2O + 4e^- = 4OH^-, \qquad (21.13)$$

reacţia fiind caracterizată de un potenţial electrochimic de echilibru, exprimat în V:

$$\varepsilon_{O_2/H_2O} = 1{,}229 - 0{,}059\,pH.$$

- Diferite *cuple redox*:

$$Fe^{+2} \leftrightarrow Fe^{+3} + e^-, \qquad (21.14)$$

$$\varepsilon_{Fe^{2+}/Fe^{3+}} = 0{,}771 + 0{,}0591 \cdot \log\frac{[Fe^{+3}]}{[Fe^{+2}]}.$$

Reacţiile anodice de distrugere propriu-zisă a metalelor în prezenţa apei sunt:

- dizolvarea fierului cu formarea ionilor feroşi:

$$Fe \leftrightarrow Fe^{+2} + 2e^-, \qquad (21.15)$$

reacţia fiind caracterizată de un potenţial electrochimic de echilibru, exprimat în V:

$$\varepsilon_{Fe/Fe^{+2}} = -0{,}44 + 0{,}0295 \cdot \log[Fe^{+2}];$$

- dizolvarea fierului cu formarea ionilor feroşi şi hidroliza acestora cu formarea hidroxidului:

$$Fe + 2H_2O = Fe(OH)_2 + 2H^+ + 2e^-, \qquad (21.16)$$

BCUVS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

reacția fiind caracterizată de un potențial electrochimic de echilibru, exprimat în V:

$$\varepsilon_{Fe/Fe(OH)_2} = -0{,}047 - 0{,}0591\,p\mathrm{H};$$

- hidroliza ionilor feroși:

$$Fe^{+2} + H_2O = FeO + 2H^+, \qquad (21.17)$$

reacție ce nu depinde de potențial, deoarece nu schimbă starea de oxidare a fierului, dar are loc la o valoare de *p*H conform expresiei:

$$\log[Fe^{+2}] = 13{,}29 - 2p\mathrm{H};$$

- oxidarea ionilor feroși la ioni ferici:

$$2Fe^{+2} + 3H_2O = Fe_2O_3 + 6H^+ + 2e^-, \qquad (21.18)$$

reacția fiind caracterizată de un potențial electrochimic de echilibru, exprimat în V:

$$\varepsilon_{Fe^{+2}/Fe(OH)_3} = 1{,}057 - 0{,}1773p\mathrm{H} - 0{,}0591[Fe^{+2}];$$

- oxidarea oxidului feros la oxid feric:

$$2FeO + H_2O = Fe_2O_3 + 2H^+ + 2e^-, \qquad (21.19)$$

reacția fiind caracterizată de un potențial electrochimic de echilibru, exprimat în V:

$$\varepsilon_{Fe(OH)_2/Fe(OH)_3} = 0{,}271 - 0{,}0591p\mathrm{H};$$

- hidroliza ionilor ferici:

$$2Fe^{+3} + 3H_2O = Fe_2O_3 + 6H^+, \qquad (21.20)$$

reacție ce nu depinde de potențial, dar se desfășoară la o valoare de *p*H conform ecuației:

$$\log[Fe^{+3}] = -0{,}072 - 3p\mathrm{H}.$$

Echilibrul fiecărei reacții electrochimice este descris de potențialul de semicelulă în acord cu ecuația lui Nernst, pe baza cărora Pourbaix a trasat diagrama de echilibru termodinamic (fig. 21.7) a stabilității fierului în apă la 25°C. Dintre domeniile de activitate termodinamică utilizate în diagramele Pourbaix au fost selectate, în mod arbitrar, cele corespunzătoare valorii de 10^{-2} mol·L^{-1}, valoare întâlnită frecvent în condițiile coroziunii microbiene. De asemenea, au fost omise valorile de potențial corespunzătoare unor valori de $p\mathrm{H} > 11$ întrucât creșterea microorganismelor este limitată la $p\mathrm{H} = 11$.

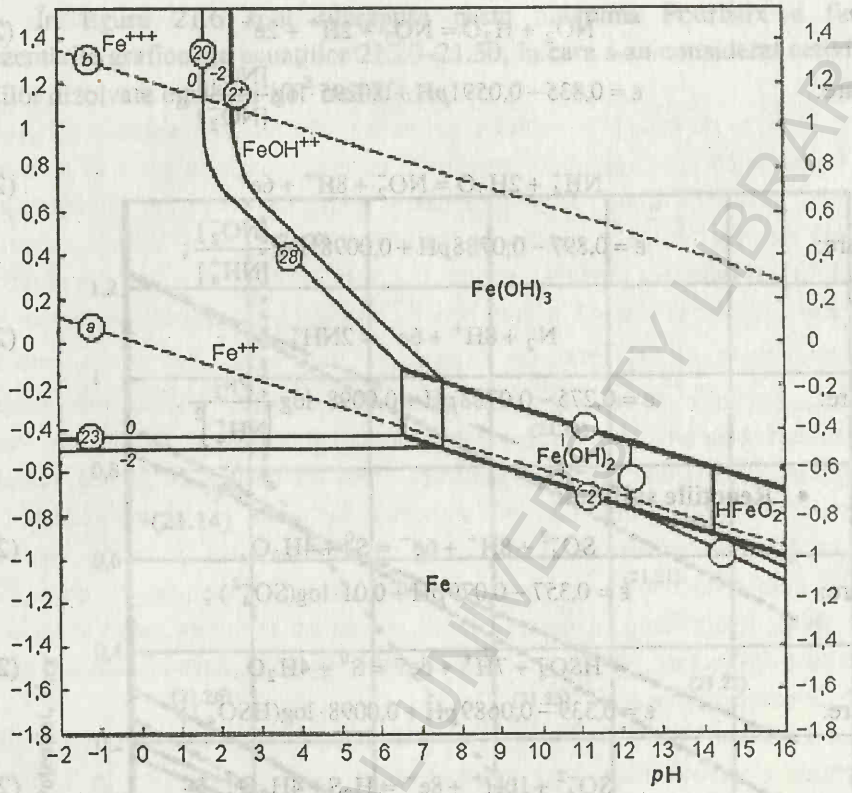


Fig. 21.7. Diagrama de echilibru a sistemului Fe–H_2O la 25°C.

21.7.2. Creşterea electrochimică a microorganismelor

Fiecare tip de microorganism este genetic adaptat să intermedieze una sau mai multe reacţii electrochimice. Reacţia electrochimică corespunzătoare se desfăşoară în mod normal, fără mediere bacteriană, extrem de lent, dar în anumite condiţii de *p*H sau de potenţial ea se poate desfăşura rapid.

Dintre reacţiile electrochimice furnizoare de substanţă şi energie, cele mai importante pentru metabolismul microbial sunt cele referitoare la principalele elemente biogene: azotul, sulful, carbonul. În acest context au fost selectate nouă reacţii electrochimice, cunoscute ca fiind de mare importanţă atât pentru coroziunea microbiană, cât şi pentru ecologia microbiană.

- **Reacţiile azotului:**

$$2NO_3^- + 12H^+ + 10e^- = N_2 + 6H_2O, \qquad (21.21)$$

în care: $\varepsilon = 1{,}246 - 0{,}0709\,p\mathrm{H} + 0{,}0059 \cdot \log \dfrac{[NO_3^-]^2}{p_{N_2}}$;

$$NO_2^- + H_2O = NO_3^- + 2H^+ + 2e^-, \quad (21.22)$$

în care: $$\varepsilon = 0{,}835 - 0{,}0591 pH + 0{,}0295 \cdot \log \frac{[NO_3^-]}{[NO_2^-]};$$

$$NH_4^+ + 2H_2O = NO_2^- + 8H^+ + 6e^-, \quad (21.23)$$

în care: $$\varepsilon = 0{,}897 - 0{,}0788 pH + 0{,}0098 \cdot \log \frac{[NO_2^-]}{[NH_4^+]};$$

$$N_2 + 8H^+ + 6e^- = 2NH_4^+, \quad (21.24)$$

în care: $$\varepsilon = 0{,}275 - 0{,}0788 pH + 0{,}0098 \cdot \log \frac{p_{N_2}}{[NH_4^+]^2}.$$

- **Reacțiile sulfului:**

$$SO_4^{-2} + 8H^+ + 6e^- = S^0 + 4H_2O, \quad (21.25)$$

în care: $$\varepsilon = 0{,}357 - 0{,}079 pH + 0{,}01 \cdot \log(SO_4^{-2});$$

$$HSO_4^- + 7H^+ + 6e^- = S^0 + 4H_2O, \quad (21.26)$$

în care: $$\varepsilon = 0{,}339 - 0{,}0689 pH + 0{,}0098 \cdot \log(HSO_4^-);$$

$$SO_4^{-2} + 10H^+ + 8e^- = H_2S + 4H_2O, \quad (21.27)$$

în care: $$\varepsilon = 0{,}303 - 0{,}0739 pH + 0{,}0074 \cdot \log \frac{[SO_4^{-2}]}{p_{H_2S}};$$

$$S^0 + 2H^+ + 2e^- = H_2S, \quad (21.28)$$

în care: $$\varepsilon = 0{,}142 - 0{,}059 pH - 0{,}03 \cdot \log(H_2S).$$

- **Reacțiile carbonului:**

$$CO_2 + 8H^+ + 8e^- = CH_4 + 2H_2O, \quad (21.29)$$

în care: $$\varepsilon = 0{,}169 - 0{,}0591 pH + 0{,}0074 \cdot \log \frac{p_{CO_2}}{p_{CH_4}};$$

$$6CO_2 + 24H^+ + 24e^- = C_6H_{12}O_6 + 6H_2O, \quad (21.30)$$

în care: $$\varepsilon = 0{,}015 - 0{,}079 pH - 0{,}002 \cdot \log \frac{P_{CO_2}^6}{[C_6H_{12}O_6]}.$$

Trebuie subliniat faptul că, spre deosebire de reacțiile prezentate în *Atlasul echilibrelor electrochimice*, aici au fost prezentate în sensul în care ele se desfășoară în metabolismul microbial.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În figura 21.6 sunt suprapuse peste diagrama Pourbaix a fierului reprezentările grafice ale ecuațiilor 21.20–21.30, în care s-au considerat activitățile speciilor dizolvate egale cu 10^{-2} mol·L^{-1}.

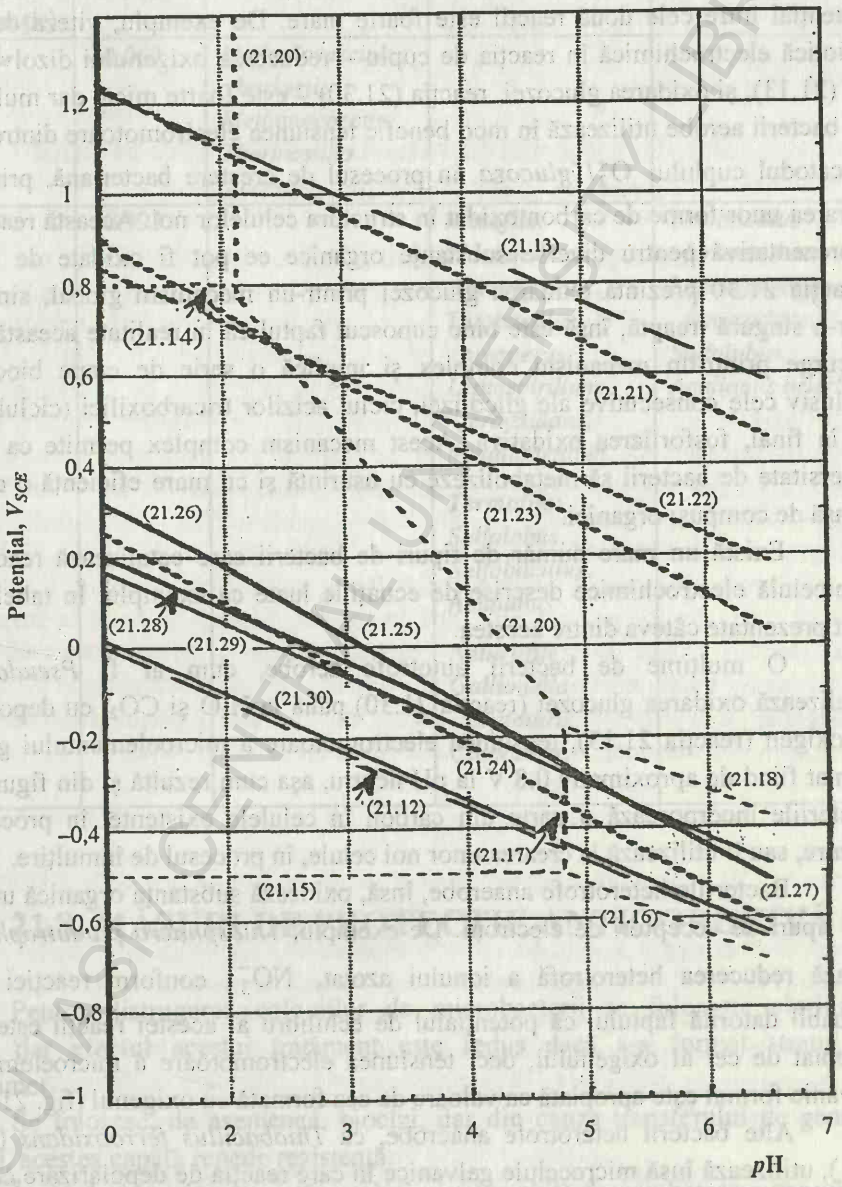


Fig. 21.8. Suprapunerea reprezentărilor grafice ale echilibrelor reacțiilor 21.20–21.30 peste diagrama Pourbaix a fierului.

Bacteriile au dezvoltată genetic, în mod special, capabilitatea de a cataliza reacțiile electrochimice cuplate anodic și catodic din grupa de reacții de semicelulă 21.20–21.30.

Viteza de reacție a cuplelor galvanice selectate din reacțiile 21.20–21.30 este foarte mică la temperatura camerei și la diluții mari, cu toate că diferența de potențial între cele două reacții este foarte mare. De exemplu, viteza de reacție abiotică electrochimică în reacția de cuplu – reducerea oxigenului dizolvat, reacția (21.13), și oxidarea glucozei, reacția (21.30) – este foarte mică, dar multe tipuri de bacterii aerobe utilizează în mod benefic tensiunea electromotoare dintre anodul și catodul cuplului $O_2^+/^-$*glucoza* în procesul de creștere bacteriană, prin încorporarea unor forme de carbon oxidat în structura celulelor noi. Această reacție este reprezentativă pentru diverse substanțe organice ce pot fi oxidate de bacterii. Reacția 21.30 prezintă oxidarea glucozei printr-un mecanism global, simplificat într-o singură treaptă, însă este bine cunoscut faptul că în realitate această reacție decurge printr-un mecanism complex și implică o serie de etape biochimice, inclusiv cele consecutive ale glicolizei, ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs) și, în final, fosforilarea oxidativă. Acest mecanism complex permite ca o mare diversitate de bacterii să metabolizeze cu ușurință și cu mare eficiență o cantitate uriașă de compuși organici.

Există un mare număr de tipuri de bacterii care catalizează reacțiile de semicelulă electrochimice descrise de ecuațiile luate ca exemplu. În tabelul 21.1 sunt prezentate câteva dintre acestea.

O mulțime de bacterii autotrofe aerobe, cum ar fi *Pseudomonas*, catalizează oxidarea glucozei (reacția 21.30) până la H_2O și CO_2, cu depolarizare de oxigen (reacția 21.13), tensiunea electromotoare a microelementului galvanic format fiind de aproximativ 0,8 V la *p*H neutru, așa cum rezultă și din figura 21.2. Bacteriile încorporează o parte din carbon în celulele existente, în procesul de hrănire, sau îl utilizează la crearea unor noi celule, în procesul de înmulțire.

Bacteriile heterotrofe anaerobe, însă, oxidează substanța organică utilizând alte tipuri de acceptori de electroni. De exemplu, *Thiosphaera pantotropha* facilitează reducerea heterotrofă a ionului azotat, NO_3^-, conform reacției 21.21, probabil datorită faptului că potențialul de echilibru al acestei reacții este foarte apropiat de cel al oxigenului, deci tensiunea electromotoare a microelementului galvanic format este apropiată ca valoare de cea formată cu oxigenul (fig. 21.8).

Alte bacterii heterotrofe anaerobe, ca *Thiobacillus ferrooxidans* (tabelul 21.1), utilizează însă microcelule galvanice în care reacția de depolarizare catodică este cea de oxidare a ionilor feroși Fe^{+2} la ioni ferici Fe^{+3}. Aceștia din urmă sunt specii extrem de corozive, care au o hidroliză puternic acidă, determinând scăderea *p*H-lui la valori mai mici ca 3.

Tabelul 21.1

Bacterii ce catalizează coroziunea fierului prin reacţii de oxidare

Reacţia catodică de reducere (nr. ecuaţie)	Potenţial [V]	Coroziunea fierului prin reacţii de oxidare:		
		Fe/Fe^{+2}	$Fe^{+2}/Fe(OH)_2$	Fe^{+2}/Fe^{+3}
CO/CH_4 (21.30)	–0,067	*Methanosarcina barkerii, Methanococcus, Thermositho coccus*		
O_2/OH^- (21.)	0,993		*Mesofile: Thiobacillus ferrooxidans, Thiobacillus prosperus, Leptospirillum ferooxidans, Metallogenium* *Termofile: Sulfolobus, Sulfobacillus, Acidianus* *Neutrofile: Gallionella Leptothrix, Clonothrix,*	*Thiobacillus ferrooxidans, Leptrospirillum ferooxidans, Sulfolubus, Acidianus brierly*

21.8. MĂSURI DE PROTECŢIE ANTICOROZIVĂ

Pentru distrugerea coloniilor de microbacterii se foloseşte clorinarea apelor, dar efectul acestui tratament este redus dacă s-a format stratul de exopolimer.

Se folosesc, de asemenea, biocizi, dar din cauza transferului de gene la bacterii, acestea capătă repede rezistenţă.

În mod obişnuit nu există o soluţie convenabilă de combatere a coroziunii microbiologice.

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

21.9. DEPOLUAREA BIOLOGICĂ

Depoluarea biologică aerobă se realizează practic în bazine mari, în care timpul de rezidenţă variază între 30 şi 60 de zile. Acolo unde acest lucru nu este posibil, se pot utiliza reactoarele de depoluare rapidă, în care timpul de rezidenţă este de 12–48 ore, iar raportul hrană/microorganisme (*H/M*) este destul de mic, astfel încât să nu producă oxidarea materialului organic.

21.9.1. Principalii parametri tehnologici ai unui procedeu de depoluare biologică

Materialul organic poate fi sintetizat într-un material celular nou, poate fi distrus complet până la CO_2 şi H_2O, sau poate fi transformat în molecule organice mai mici, adică poate fi metabolizat. Aceste molecule mici pot fi transformate prin digestie complet în CO_2. Pe măsură ce microorganismele se înmulţesc, cantitatea de hrană disponibilă începe să le limiteze creşterea, ceea ce înseamnă că apar modificări în structura populaţiei de microorganisme: coloniile de bacterii încep să formeze flocoane biologice. Dacă nu se introduce o cantitate de hrană suplimentară, începe creşterea unei faze endogene, în care bacteriile devin canibale şi se mănâncă între ele. Acest raport hrană/microorganisme (*H/M*), care poate fi măsurat, este un parametru de bază în proiectarea reactoarelor de depoluare biologică cu aerare, cum ar fi bazinele de şlam activ. Hrana reprezintă consumul biochimic de oxigen, *CBO*, în apa poluată care intră în reactor. Materialul solid în suspensie în bazinele de incubare este format în cea mai mare parte din masa de microorganisme, astfel încât densitatea populaţiei se poate calcula plecând de la concentraţia acesteia în incubator (în laborator), exprimată în $mg \cdot L^{-1}$, ţinând cont de volumul reactorului. În acest caz, raportul *H/M* se poate calcula cu relaţia:

$$\frac{H}{M} = \frac{COB_i}{C_s x \tau}$$

în care: COB_i reprezintă consumul biochimic de oxigen în apa reziduală înainte de intrarea în reactor; C_s reprezintă concentraţia masei de bacterii, în $mg \cdot L^{-1}$; iar τ este timpul de rezidenţă a apei în reactor. Acesta se calculează cunoscând volumul reactorului (în m^3) şi debitul de alimentare al acestuia cu apă poluată (în $m^3 \cdot h^{-1}$).

Pentru un calcul mai precis trebuie să se ţină seama de fracţia volatilă a materialului solid, care de multe ori este apreciabilă şi poate atinge 70% din totalul masei solide în suspensie. Proiectarea acestor reactoare trebuie să asigure o cantitate minimă de oxigen dizolvat, în jurul valorii de $2 mg \cdot L^{-1}$.

Temperatura. Temperatura este un parametru foarte important în procesul de depoluare biologică, astfel încât trebuie să se ţină seama de modificările zilnice sau sezoniere ale temperaturii mediului ambiant. Ca orice alt parametru ecologic şi temperatura se caracterizează printr-un domeniu de toleranţă cu limite superioară şi inferioară şi temperatură optimă.

În funcție de valoarea temperaturii optime microorganismele se clasifică în: *psihrofile*, *mezofile* și *termofile*. Importanța acestui parametru rezultă din raportul dintre organismele psihrofile, mezofile, facultative și termofile, fiecare dintre ele având o temperatură preferențială – temperatura la care randamentul metabolic este maxim.

Fiecare dintre aceste categorii de microorganisme se caracterizează printr-o dublare a vitezei de metabolizare la fiecare creștere a temperaturii cu 11°C. Acest lucru este de o importanță deosebită deoarece în timpul iernii bazinele pot să rămână într-o stare de inactivitate biologică la temperaturi de 0°C.

Trebuie subliniat faptul că valori termice sub limita inferioară nu sunt de regulă letale, dar încetinesc ritmul biologic de creștere, microorganismele intrând într-o fază de „adormire" pentru perioade lungi de timp; de aceea, în timpul iernii lagunele de depoluare funcționează la randamente foarte scăzute.

***p*H-ul.** *p*H-ul este un alt factor de mediu care influențează și poate limita viteza de creștere a microorganismelor. Domeniul de *p*H optim pentru activitatea majorității bacteriilor este cuprins între 5 și 8 și orice abatere de la acest interval de toleranță biologică afectează puternic activitatea acestora. Majoritatea fungilor preferă un mediu acid, cu limita inferioară între 1 și 3 și valoarea preferențială, 5. Algele albastre se dezvoltă în condiții optime la valori de *p*H mai mari de 7. Există însă și excepții: astfel, bacteriile sulfoxidante, ca *Thiobacillus thiooxidantus*, se dezvoltă la *p*H acid de 2–3,5. Modificările de *p*H ale mediului sunt de regulă o consecință a activității metabolice a microorganismelor.

Hrana. Microorganismele au nevoie și de hrană suplimentară față de încărcătura organică, așa cum indică formula chimică empirică a protoplasmei bacteriene $C_{60}H_{87}O_{23}N_{12}O$. Ca o regulă, de asemenea, empirică, sistemul are nevoie de aproximativ 5 părți de azot ca azot atomic (N) și o parte de fosfor ca fosfor atomic (P) pentru fiecare 100 părți de *CBO* în apa reziduală. Foarte multe ape reziduale, în mod particular șlamul municipal, conțin cantitatea necesară de azot, dar apele reziduale industriale au nevoie de un aport suplimentar de nutrienți, adăugați de regulă ca săruri de amoniu și acid fosforic.

Deoarece în marea majoritate a cazurilor apele reziduale conțin o multitudine de compuși organici care nu pot fi individualizați, este absolut necesară în procesul de proiectare și conducere a sistemelor de depoluare biologică realizarea testelor de laborator, urmate de teste pe instalații pilot pentru obținerea datelor necesare. De asemenea, trebuie foarte bine cunoscute debitul și constanța temperaturii și încărcăturii organice prin analize statistice efectuate pe perioade lungi de timp. Pentru menținerea constantă a vitezei de trecere a apei prin reactor sunt necesare rezervoare tampon de stocare a apei reziduale.

Determinarea cantității de oxigen și de hrană suplimentară se realizează prin prelevarea unui eșantion de șlam din incubator după un timp egal cu cel din reactor (de exemplu, la un debit de 100 $mL \cdot h^{-1}$ timpul de rezidență este de 150 ore) și se măsoară volumul de șlam (nămol). Procedura se repetă la intervale de timp

stabilite, de exemplu la 10 zile, atâta timp cât debitul este constant; o dată cu schimbarea debitului se modifică timpul de rezidență și deci și cel de aclimatizare. Aglomerarea șlamului presupune creșterea vitezei de alimentare după perioada de aclimatizare. De asemenea, trebuie efectuate studii asupra vitezei. Acestea se derulează periodic la 1–2 săptămâni, la o viteză de alimentare constantă și se stabilește gradul de evacuare după diferiți timpi de rezidență. Pentru acest lucru trebuie caracterizată apa reziduală prin determinarea *CCO*, *CBO*, *TOC*, *p*H, temperatură și cantitatea totală de solid dizolvată. Acest tip de test oferă indicații asupra biodegradabilității maxime și a conținutului de oxigen care trebuie asigurat reactorului. Trebuie menționat că datorită variabilității calității apelor reziduale nu pot fi extrapolate rezultate și experiențe de la un reactor la altul, ci fiecare în parte trebuie caracterizat pentru a asigura o exploatare optimă.

21.9.2. Activarea șlamului

În cazul reactoarelor de depoluare rapide se utilizează un procedeu de activare a șlamului în scopul scăderii timpului de staționare. Aceste reactoare sunt mai compacte față de bazinele deschise, presupun un raport *H/M* foarte mare, fără să realizeze însă randamente de depoluare la fel de mari ca cele de lagună. Acest tip de uzină de prelucrare a apelor reziduale se aplică pentru sistemele municipale în care cantitatea de șlam produsă este foarte mare. Se utilizează oxigen, pentru reducerea volumului de gaz transportat, introdus prin duze sub suprafața liberă a lichidului.

Acest tip de tehnologie de depoluare se caracterizează prin producerea unei cantități importante de biomasă. În figura 21.9 este prezentată o schemă de principiu a unei uzine de depoluare biologică rapidă a apelor municipale.

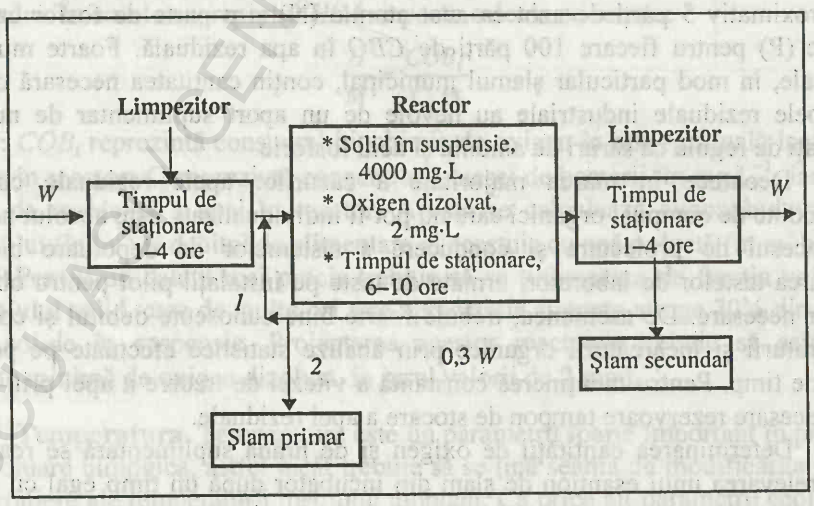


Fig. 21.9. Schema tehnologică de principiu a unei stații de tratare microbiologică a apelor municipale: *W* – debitul apei reziduale = debitul apei depoluate; *1* – reciclare; *2* – reziduu.

22. NOȚIUNI DE ECOLOGIE

22.1. INTRODUCERE

Lumea vie, extrem de diversă şi care se întinde atât pe uscat, cât şi în ape sau în atmosferă, nu este o alcătuire haotică de organisme, ci reprezintă o mare diversitate de sisteme biologice care se încadrează în niveluri şi trepte de organizare. Astfel, în unele locuri există o anumită combinaţie de plante, animale şi microorganisme, iar în alte locuri, o altă combinaţie. Aceste combinaţii au fost denumite, de biologi, **biocenoze.** În biocenoze plantele, animalele şi microorganismele nu sunt reprezentate de indivizi, ci de mulţimi denumite **populaţii.**

Populaţiile sunt legate atât între ele, cât şi cu mediul (locul geografic) pe care îl ocupă, prin raporturi multiple, printr-un schimb continuu de energie şi materie, schimb care este caracteristic pentru fiecare biocenoză în parte.

Biocenoza şi mediul cu care face schimbul de energie şi materie formează o unitate indestructibilă, care se numeşte **ecosistem.**

Ştiinţa care se ocupă cu studiul ecosistemelor este denumită **ecologie.** E. Haeckel este cel ce a definit (în 1866) ecologia ca fiind ştiinţa care se ocupă cu studiul interacţiunilor şi raporturilor dintre lumea vie şi mediul înconjurător. Termenul derivă din grecescul *oikos* („loc de viaţă").

22.2. ORGANIZAREA SISTEMICĂ A LUMII VII

22.2.1. Generalităţi

Biologi, tehnologi şi filosofi sunt de acord că organismele vii constituie o clasă specială de sisteme concrete. Pentru a sublinia caracterul lor sistemic sau integrativ, sunt denumite biosisteme.

BCU IAŞI - BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

Studiile biologice sugerează că orice biosistem ar fi un sistem chimic (**chimisistem**) de un tip foarte deosebit. Pentru a clarifica afirmația de mai sus este necesară definirea noțiunii de sistem.

Un **sistem** este un obiect complex ale cărui părți sunt într-o astfel de relație încât obiectul se comportă ca o unitate și nu ca un simplu ansamblu de elemente. Un sistem concret este un sistem ale cărui componente sunt obiecte concrete sau lucruri.

Fiecare dintre componentele sistemului concret influențează celelalte componente ale sale. Atomii, moleculele, cristalele, organismele și organizațiile sociale sunt sisteme concrete. Se disting diferite tipuri de sisteme concrete, fiecare dintre ele conținând un nivel de organizare a realității. Astfel, distingem:

1) *fizisistemele* (de exemplu: un cristal, câmpul electromagnetic etc.);
2) *chimisistemele* (de exemplu: o pilă galvanică, un reactor chimic);
3) *biosistemele* (de exemplu: o bacterie, o pădure);
4) *psihosistemele* (de exemplu: un mamifer);
5) *sociosistemele* (de exemplu: o ceată de maimuțe, o societate umană);
6) *tehnosistemele* (de exemplu: o uzină, o școală, un spital);

Pentru a recunoaște dacă un lucru este o entitate, un simplu agregat sau un sistem, trebuie să se recurgă la următoarele criterii:

a) *Primul criteriu:* Un lucru este un sistem numai dacă se comportă ca un întreg, adică dacă în totalitatea sa are legi proprii.

b) *Al doilea criteriu:* Un lucru este un sistem numai dacă își schimbă apreciabil comportamentul atunci când i se schimbă un component.

Într-o ontologie sistemică, conceptul de sistem este definibil în termenii noțiunii de lucru sau obiect fizic, proprietate a unui lucru, compoziție a unui lucru și acțiune a unui lucru asupra altui lucru. Conceptul de acțiune sau efect al unui lucru asupra altuia face posibilă definirea noțiunii de conexiune, cuplare sau legătură între două lucruri. Astfel, vom spune că două lucruri sunt cuplate (legate sau conectate) dacă unul dintre ele acționează asupra celuilalt sau dacă interacționează între ele.

Conceptul general de sistem concret se definește, după M. Bunge, astfel: un lucru *S* este un sistem concret dacă și numai dacă *S* poate fi reprezentat de următoarea triadă de mulțimi:

I. Compoziția lui *S* este reuniunea părților lui *S*, reuniune ce are cel puțin două elemente;
II. Mediul sau ambianța lui *S* este reuniunea lucrurilor concrete diferite de componentele lui *S* și care se află în relații cu acesta (acționează asupra lui *S* sau suferă acțiunea lui *S*);

III. Structura lui *S* este reuniunea relațiilor dintre componentele lui *S*, precum și a relațiilor dintre aceste componente și componentele mediului, astfel încât această reuniune include cel puțin o conexiune sau o cuplare.

În cazul nostru, înțelegem prin sisteme acele entități ale căror componente sunt legate prin conexiuni dinamice de tip reactiv. Asemenea sisteme reactive sunt sistemele chimice (chimisistemele), care poartă denumirea de reactori.

Un **chimisistem** este așadar un sistem dinamic, reactiv, ale cărui componente sunt atomii și moleculele care interacționează. Sistemele chimice se mai numesc și *reactori*.

Chimisistemele pot fi, din punct de vedere termodinamic, *închise* (fără schimb material cu mediul) și *deschise* (schimbă energie și material cu mediul). Pot exista și sisteme *semideschise* (celulele vii cu membrană), care sunt sisteme dotate cu o frontieră (membrană) care limitează tipul interacțiunilor dintre componentele sale și componentele mediului exterior.

Sistemele pot fi și *autocontrolate*, adică în sistem există un subsistem care controlează restul sistemului, sau are loc un proces (o reacție chimică) care se controlează pe sine însuși, așa cum se întâmplă cu reacțiile catalitice sau reacțiile enzimatice ai căror produși inhibă sau stimulează reacția însăși.

În ceea ce privește **biosistemele**, acestea sunt fundamental chimisisteme semideschise și autocontrolate, care iau din mediul înconjurător materia și energia pe care le folosesc, își sintetizează toate celelalte componente și se controlează singure. Controlul final al sintezei biomoleculelor în organism îl efectuează moleculele de ADN. Biosistemele se reproduc, suferă modificări și evoluează.

Deși este sigur că nici una din proprietățile fundamentale ale unui biosistem nu este prin ea însăși biologică, ansamblul proprietăților lui și unele dintre relațiile dintre acestea fac din el un biosistem. Biosistemele sunt deci chimisisteme cu caracteristici speciale, proprietățile lor nu se găsesc toate laolaltă și nici în aceleași relații ca în sistemele chimice.

Adică, chiar dacă fiecare proprietate fundamentală a biosistemelor ar putea fi întâlnită la nivel chimic, organismele posedă legi caracteristice.

Astfel, am putea afirma că viul (biosistemele):

- se deosebește de neviu (chimisistemele);
- își are originea în acesta;
- emerge din el în cursul unui proces istoric.

Așadar, organismele își constituie propriul lor sistem de organizare.

22.2.2. Emergența sistemelor

Conceptul de proprietate emergentă se aplică lucrurilor complexe sau sistemelor şi nu lucrurilor simple, cum ar fi o moleculă, un atom, un electron. De exemplu, temperatura şi entropia sunt proprietăți ale unui agregat atomic sau molecular, pe care nu le posedă nici una din componentele lui. Emergența există la orice nivel şi chiar între niveluri.

Emergența se poate defini astfel:

Fie *X* un lucru complex (concret) şi fie *P* o proprietate a lui *X*. Astfel:

- *P* este o proprietate rezultantă sau ereditară a lui *X*, dacă şi numai dacă anumite componente ale lui *X* posedă proprietatea *P*.
- *P* este o proprietate emergentă colectivă sistemică sau configurațională a lui *X*, dacă şi numai dacă nici o componentă a lui *X* nu posedă proprietatea *P*.

Emergența este explicabilă prin analiza totalității emergenței componentelor ei şi a interacțiunii dintre acestea. De exemplu, orice corp conductor electric este caracterizat de o anumită rezistivitate. Rezistența electrică nu este numai o proprietate globală sau sistemică, ci şi o proprietate emergentă deoarece nu o are nici unul din atomii care compun corpul conductor. Această proprietate emergentă poate fi explicată prin structurile electronice ale atomilor, ionilor etc.

În final, putem afirma că unele din proprietățile sistemelor sunt emergente şi că toate proprietățile emergente sunt înrădăcinate în proprietățile componentelor lor. Ceea ce este valabil pentru proprietăți este valabil şi pentru lucruri. Astfel, vom spune că un lucru concret este rezultatul altora două, dacă toate proprietățile sale, mai puțin compoziția, sunt posedate de componentele sale. În caz contrar se va numi emergent.

Astfel: lumea vie este emergentă față de sistemele biochimice, acestea față de cele chimice care, la rândul lor, sunt emergente față de cele fizice.

Cele afirmate mai sus pot fi comprimate în două postulate, unul ontologic sau privind realitatea, celălalt epistemologic sau privind cunoaşterea asupra realității [M. Bunge, 1984].

Postulatul *1* sau postulatul de emergență: Unele din proprietățile unui sistem sunt emergente.

Postulatul *2* sau postulatul de raționalitate: Fiecare proprietate emergentă a unui sistem poate fi explicată în funcție de proprietățile componenților săi şi de legăturile dintre aceştia.

Astăzi este admisă în ştiință concepția că lucrurile şi sistemele în general sunt constituite din niveluri ordonate într-un fel de piramidă. Astfel, se vorbeşte de nivelul atomic şi cel molecular, de nivelul celular şi cel al organelor etc. Se

presupune, de asemenea, că sistemele, la orice nivel mai înalt dat, sunt compuse din lucruri ce aparţin nivelului imediat precedent (fig. 22.1).

Aceasta sugerează că fiecare nivel mai înalt constă din sisteme constituite cu componenţi aparţinând nivelului imediat anterior, şi că fiecare nivel se scindează în subniveluri. Astfel, nivelul biologic poate fi subdivizat în subniveluri ale celulelor organului, organismului, populaţiei şi ecosistemului.

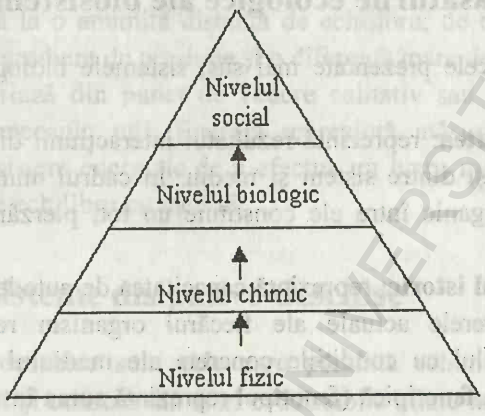


Fig. 22.1. Piramida nivelurilor de organizare a lumii (săgeţile indică sensul de emergenţă).

Piramida nu sugerează subordonare sau superioritate, ci faptul că cu cât un sistem este mai înalt, cu atât este mai dependent şi mai puţin populat.

Faptul că din punct de vedere matematic sistemele sunt mulţimi ordonate sugerează conformitatea cu teoria mulţimilor [M. Bunge, 1984]:

Fie L o familie de mulţimi nevide, L_i lucruri cu $1 \le i \le n$. Dacă L_i şi L_j sunt membri ai lui L, atunci L_i posedă L_j dacă şi numai dacă fiecare membru al lui L_j este exclusiv compus din lucruri în L_i. În simboluri, $L_i \langle L_j = \forall x \left(x \in L_j \Rightarrow C(x) \subset L_i \right)$, unde C este funcţia de compunere (pune în corespondenţă mulţimea de lucruri cu mulţimea de puteri a celei din urmă, astfel încât dacă x este un lucru, atunci $C(x)$ = mulţimea părţilor lui x).

Trebuie subliniat faptul că nivelurile fiind mulţimi (un concept şi nu un lucru), atunci:

– ele nu pot acţiona unul asupra celuilalt – nivelurile superioare nu pot controla şi nici nu pot asculta de niveluri inferioare;

– relaţia dintre niveluri nu este nici de la parte la întreg şi nici relaţia de incluziune dintre mulţimi, ci o relaţie specifică, definibilă în termenii parte, întreg.

Conform teoriei nivelurilor şi a principiului ierarhic, fiecare lucru aparţine unui nivel, iar un nivel precede pe altul numai în cazul în care furnizează

componenți pentru sistemele din nivelul imediat superior. Componenții unui sistem sunt, de asemenea, precursorii lui într-un proces evolutiv; cu alte cuvinte, fiecare lucru complex aparținând unui nivel dat este autoasamblat din lucruri ale nivelului precedent. Altfel spus, nivelurile superioare emerg din cele inferioare printr-un proces natural, evolutiv de autoasamblare.

22.2.3. Trăsăturile ecologice ale biosistemelor

În acord cu cele prezentate mai sus, sistemele biologice au următoarele caracteristici:

1. **Integralitatea**: reprezintă rezultatul interacțiunii dintre părțile componente ale sistemului și dintre sistem și mediu. În cadrul unui sistem elementele constitutive legate organic între ele constituie un tot, pierzându-și determinarea cantitativă proprie.

2. **Caracterul istoric**: reprezintă capacitatea de autodezvoltare și evoluție a sistemului. Caracterele actuale ale fiecărui organism reprezintă rezultatul interacțiunii genotipului cu condițiile concrete ale mediului în care a trăit. În concluzie, exprimarea fenotipică (fenotipul reprezintă suma însușirilor biochimice, morfologice, fiziologice și de comportament ale unui organism ca rezultat al interacțiunii dintre genotip și mediu) și genotipică a unei populații, la un moment dat, conține condensată întreaga istorie a luptei pentru existență.

3. **Caracterul informațional**: prin caracterul lor istoric, biosistemele dispun de o bogată zestre informațională transmisă de generațiile anterioare, alături de informațiile furnizate de mediul intern și extern ale acestuia. Sistemul informațional al viețuitoarelor este capabil de a recepționa, prelucra, acumula și de a transmite informații prin intermediul fluxului de energie. Pe această bază biosistemele pot elabora programe de autoconservare etc.

4. **Echilibrul dinamic**: reprezintă schimbul de energie, substanță și informație a sistemelor biologice cu mediul.

5. **Heterogenitatea**: reprezintă diversificarea elementelor interne constitutive ale biosistemelor. Această creștere a heterogenității stă la baza evoluției biosistemelor.

6. **Autoreglarea**: reprezintă controlul și reglarea automată a propriei funcționalități și se realizează prin recepția, circulația, stocarea și prelucrarea informațiilor.

7. **Calitatea de sistem deschis**: fenomenologia celor mai multe sisteme naturale arată că o mare parte a lumii conține structuri coerente la neechilibru, cum ar fi celulele de convecție, reacțiile chimice autocatalitice și viața însăși.

Termodinamica este aplicabilă tuturor sistemelor ce implică energie și lucru mecanic: sisteme de tipul temperatură–volum–presiune, sisteme cinetice,

sisteme chimice, sisteme electromagnetice, sisteme cuantice. Termodinamica se ocupă cu explicarea comportării sistemelor în trei cazuri:

a) cazul sistemelor la echilibru – termodinamica clasică; de exemplu, sistemele închise;

b) cazul sistemelor aflate la o anumită distanță de echilibru și care revin la echilibru;

c) cazul sistemelor scoase din starea de echilibru și forțate de anumiți gradienți să rămână la o anumită distanță de echilibru; de exemplu, două incinte între care există un gradient de presiune și o diferență mare de molecule.

Energia variază din punct de vedere calitativ sau al capacității ei de a efectua un lucru mecanic util. Energia reprezintă măsura capacității maxime (abilitatea) a unui sistem energetic de a efectua un lucru mecanic util, în timp ce tinde spre o stare de echilibru cu mediul.

22.2.4. Sisteme disipative-deschise

Sistemele deschise sunt cele care prezintă schimburi energetice și de substanță cu mediul și constau din stări cvasistabile aflate la distanță de echilibru. Pentru realizarea proceselor de autoorganizare, sistemele organizate nevii, cum ar fi celulele de convecție, tornadele și laserii, precum și sistemele vii depind de fluxurile exterioare de energie. Așa cum a arătat I. Prigogine, sistemele deschise sunt structuri disipative menținute departe de echilibru prin schimb de energie și materie. Astfel, el propune un nou principiu de ordine, care poate fi definit *ordine prin fluctuație*.

În realitate, structurile disipative pot fi considerate o nouă stare de ordine a materiei indusă printr-un flux de energie liberă în condiții de neechilibru termodinamic. Această organizare presupune creșterea entropiei sistemului global care include și sistemul considerat. În sistemele disipative schimbul total de entropie reprezintă suma dintre entropia sistemului, care este totdeauna mai mare sau egală cu zero, și entropia cedată de sistem. Schimbul energetic cu mediul al oricărui sistem poate fi negativ, egal cu zero sau pozitiv. Pentru ca sistemul să se mențină într-o stare de neechilibru constantă, schimbul de entropie *S–M* trebuie să fie negativ și egal cu entropia produsă prin procesele interne, ca în cazul metabolismului.

Studiul acestor sisteme se realizează utilizând un corolar al **Principiului unificat al termodinamicii** al lui Kestin. *Atunci când un sistem a fost scos din echilibru, el va utiliza toate posibilitățile pentru a contracara gradienții aplicați. Dacă gradienții cresc, crește și abilitatea sistemului de a se opune unei și mai mari îndepărtări de echilibru.*

Acest corolar al principiului unificat reprezintă, de fapt, o nouă formulare a principiului al II-lea al termodinamicii. În sistemele chimice, principiul lui Le Chatelier este o exemplificare a principiului al II-lea reformulat prin acest corolar.

Sistemele termodinamice, ai căror principali parametri de stare sunt temperatura, presiunea şi echilibrul chimic, se opun tendinţei de a fi scoase din starea de echilibru, iar atunci când asupra lor acţionează o constrângere ele îşi schimbă starea într-un mod care se opune constrângerii şi încearcă să readucă sistemul la starea de echilibru. Cu cât sistemul este îndepărtat mai mult de la starea de echilibru, cu atât sunt mai complicate şi mai sofisticate mecanismele prin care sistemul se opune. Atunci când condiţiile dinamice şi cinetice permit, apar procese de autoorganizare care au ca efect disiparea gradientului perturbator.

În aceste situaţii, din dezordinea specifică şi caracteristică sistemelor la echilibru apar structuri organizate tocmai pentru a nu permite distrugerea echilibrului. Avem de a face cu crearea *ordinii din dezordine* – sesizată de Schrodinger – în formarea structurilor disipative.

Gradienţii termodinamici dirijează autoorganizarea sistemelor prin mecanisme specifice. Astfel, gradienţii chimici duc la reacţii autocatalitice disipative. Sistemele cu reacţii autocatalitice sunt o formă de *feedback* pozitiv în care activitatea sistemului se amplifică în forma reacţiilor de autoîntărire, activitate cu caracter autoorganizator care reprezintă o modalitate importantă de creştere a capacităţii disipative a sistemului.

Noţiunea de sistem disipativ se aplică sistemelor fizice şi chimice la neechilibru şi descrie procesele de apariţie şi dezvoltare ale sistemelor complexe.

Conceptul de ordine a lui Schrodinger se referă la apariţia acestor sisteme disipative, fenomen observat în special în cea de a treia clasă a sistemelor termodinamice.

22.3. FACTORII ECOLOGICI ŞI LEGILE FUNDAMENTALE ALE ACŢIUNII ACESTORA

Componentele mediului de viaţă care acţionează direct asupra organismelor în diferitele faze ale dezvoltării lor se numesc **factori ecologici.**

22.3.1. Legile de acţiune ale factorilor ecologici

Factorii ecologici acţionează asupra răspândirii organismelor vii pe Pământ, modifică procentul de fecunditate, elimină unele specii etc.

Pe baza interacțiunii dintre ereditate și factorii de mediu se realizează noi genotipuri, se desfășoară evoluția organismelor. Factorii ecologici determină viețuitoarele să se adapteze în permanență la condițiile de mediu existente. Plasticitatea genetică a organismelor le dă posibilitatea ca ele să răspundă adecvat noilor condiții. În acest caz, factorii ecologici au o acțiune **favorizantă**. Dacă însă frânează dezvoltarea organismelor vii, factorii ecologici se numesc **limitanți.**

Acțiunea factorilor ecologici este guvernată de o serie de legi, cum sunt:

a) **Legea minimului**, formulată de J. von Liebig în secolul al XIX-lea, arată că rolul determinant în dezvoltarea vieții îl are nutrientul care se găsește în cantitate mică (de exemplu, oligoelementele necesare dezvoltării organismelor).

b) **Legea toleranței** arată că orice factor prezintă anumite limite (minimă și maximă) în interiorul cărora organismele se dezvoltă (de exemplu, limitele de toleranță termică pentru animale sunt 0 și 50°C).

c) **Legea interacțiunii factorilor** arată că un factor acționează împreună cu alți factori asupra dezvoltării organismelor vii. Efectul acestei interacțiuni depinde de ansamblul factorilor ecologici (temperatură, umiditate, lumină).

22.3.1. Clasificarea factorilor ecologici

Factorii ecologici se clasifică în: factori abiotici, factori alimentari și factori biotici.

22.3.1.1. Factorii ecologici abiotici

a) **Temperatura.** Pentru fiecare specie există o valoare minimă și una maximă efectivă de temperatură între care organismele vii duc o activitate normală. Temperatura la care activitatea organismului viu se desfășoară cu randament maxim se numește *temperatură preferențială*. Această temperatură este diferită de la o specie la alta și variază în funcție de stadiul de dezvoltare a speciei. Temperatura la care viața unei viețuitoare nu mai este posibilă se numește *temperatură letală*. Fiecare specie prezintă o temperatură letală inferioară și una superioară. Preferințele termice sunt modificate de activitatea fiziologică, de exemplu de foame.

După modul în care suportă variațiile de temperatură, organismele vii se împart în: organisme *stenoterme*, care suportă variații mici de temperatură, și organisme *euriterme*, care suportă variații mari de temperatură. Temperatura, împreună cu alți factori ecologici influențează următoarele aspecte legate de biosferă: repartiția geografică a speciilor, activitatea lor vitală, cantitatea de hrană pe care o consumă, precum și adaptări morfologice și variații de metabolism, cum ar fi amorțirea, estivația (prevenirea hipertermiilor), hibernarea.

b) **Umiditatea.** Apa este unul dintre constituenții principali ai materiei vii. Organismele vii conțin între 50 și 98% (unele meduze) apă. Țesuturile tinere sunt mai bogate în apă față de cele mai bătrâne. După gradul de umiditate de care au nevoie organismele, se disting:

- specii *higrofile* – trăiesc în medii saturate sau aproape saturate de apă;
- *mezohigrofile* – au nevoie moderată de apă: majoritatea mamiferelor;
- *xerofile* – au nevoie redusă de apă.

Umiditatea influențează hotărâtor dezvoltarea și longevitatea viețuitoarelor. În adăpostul animalelor este nevoie de o umiditate relativă, între 75 și 85%, pentru ca activitatea metabolică a acestora să fie optimă. Ploile pot afecta pozitiv viața animalelor – de exemplu, le curăță blana, le activează circulația – sau dimpotrivă, pot avea o influență negativă. Cantitatea de umiditate pe care o au la dispoziție diferitele viețuitoare poate produce modificări morfologice, cum ar fi: cocoașa cămilei, ce reprezintă o rezervă de apă, sau tegumentele unor animale, care împiedică pierderile de apă; plantele de deșert au frunzele reduse ca dimensiuni până la țepi și acoperite cu cerum pentru a împiedica pierderile de apă prin transpirație.

De asemenea, apa influențează răspândirea geografică a speciilor. Umiditatea este un factor fundamental în structurarea biocenozelor.

c) **Lumina.** Lumina acționează prin intensitate, lungime de undă și durată. Intensitatea luminii determină activitatea unor animale. Influența lungimii de undă poate fi exemplificată de exemplul radiațiilor ultraviolete: acestea stimulează producerea de ergosterină, fundamentală pentru sinteza vitaminei D_2, sau în cantitate prea mare distrug viața, deci au o influență nefastă. Rolul ecologic esențial al luminii constă, însă, în întreținerea ritmurilor biologice prin alternanța zi/noapte și în catalizarea procesului de fotosinteză.

d) **Vântul, curenții de aer.** Influențează schimburile termice și hidrice cu mediul, zborul păsărilor și insectelor, vegetația.

e) **Presiunea atmosferică.** Presiunea atmosferică afectează densitatea animalelor; aceasta scade o dată cu scăderea presiunii.

f) **Ionizarea aerului.** Ionii pozitivi a căror concentrație crește în atmosferă înainte de furtună produc o activare metabolică, agită, în timp ce ionii negativi ce apar după furtună au un efect calmant.

g) **Câmpul electric.** Se pare că influențează activitatea ființelor vii, dar acest mecanism este mult mai complex.

h) **Oxigenul.** Oxigenul este un factor ecologic fundamental pentru viață. În aer, apă, spații închise, cantitatea de oxigen este variabilă. Organismele vii și-au creat adaptabilitatea la cantitatea de oxigen pe care o au la dispoziție.

i) **Presiunea hidrostatică.** Aceasta este foarte importantă pentru viața din mediul marin.

j) **Factorul *p*H.** Din punct de vedere al valorii factorului *p*H, se cunosc specii acidofile, bazofile și neutrofile. Majoritatea speciilor sunt neutrofile, astfel peștii mor dacă *p*H-ul scade la 3–3,5. *p*H-ul solului permite dezvoltarea unei flore și faune specifice.

k) **Undele mecanice și vibrațiile, sunetele, infrasunetele.** Acestea au efecte epuizante pentru psihicul uman și stresante pentru animalele domestice din marile complexe. Undele mecanice prezintă prag letal.

l) **Oscilațiile termice.** Oscilațiile termice pot produce slăbirea rezistenței la acțiunea agenților patogeni, declanșând boli infecțioase și parazitare.

m) **Mediul acvatic.** Pentru mediul acvatic, proprietățile fizice (de exemplu: temperatura, presiunea, turbiditatea) și proprietățile chimice (de exemplu: *p*H, mineralizare, oxigen dizolvat, H_2S, CO_2, acizi humici) acționează ca factori ecologici fundamentali.

n) **Solul.** Solul reprezintă un biotop complex, fiind populat cu floră și faună diverse. Dintre factorii abiotici ai solului menționăm: conținutul de apă, structura, textura, aerația, salinitatea, *p*H-ul, conținutul în elemente minerale. Indirect, solul poate influența dezvoltarea speciilor de animale prin producția vegetală, și anume, cantitatea de producători, prin focare de microbi sau viruși patogeni pe anumite suprafețe.

22.3.1.2. Factorii ecologici alimentari

Pentru creștere și dezvoltare animalele au nevoie de hrană, care reprezintă unica sursă de energie. Din acest motiv factorii alimentari joacă un rol decisiv pentru viața ființelor vii. Factorii alimentari contribuie la adaptarea organismelor la condițiile concrete din biotopuri.

22.3.1.3. Factorii ecologici biotici

Efectele interacțiunii dintre viețuitoare, precum și dintre acestea și mediu produc modificări în structura și funcționalitatea biocenozelor. Relațiile dintre indivizii aceleiași specii în acțiunile de hrănire, reproducere și apărare se definesc ca relații intraspecifice, iar relațiile dintre indivizii diferitelor specii care trăiesc în același biotop definesc raporturi interspecifice.

Relațiile intraspecifice. Relațiile intraspecifice sunt, în general, relațiile de canale de comunicare – prin semnale acustice, optice, biochimice, prin feromoni – care stabilesc relații ierarhice, relațiile de apărare, de reproducere, de marcare a teritoriului. *Efectul de grup* reflectă interacțiunea în grupul de indivizi de

densitate optimă care își asigură hrana, se apără de dușmani și se reproduc în condiții avantajoase. *Competiția intraspecifică* apare în anumite condiții de densitate având ca mobil asigurarea hranei. *Efectul de masă și cel de supraaglomerare* sunt defavorabile speciei și apar în competiția pentru câștigarea locului de viață sau a sursei de hrană la populații supraaglomerate.

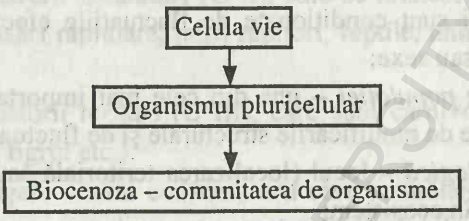
Relațiile interspecifice. Relațiile dintre speciile unei biocenoze se manifestă într-o mare diversitate, astfel încât nu s-a reușit până astăzi o sistematizare completă. În general, interacțiunile pot fi: *pozitive*, ducând la creșterea numerică, *negative*, determinând descreșterea numerică a speciei, sau *neutre*. Deci, după efectele acestor relații, ele pot fi clasificate ca *avantajoase* sau *conflictuale*. Astfel, distingem:

- *neutralismul* – reprezintă stabilirea unor relații de indiferență între membrii speciilor diferite ce trăiesc în același biotop;
- *cooperarea* – constă în relații de asociere interspecifică avantajoase, neobligatorii;
- *simbioza* – reprezintă asocierea avantajoasă între parteneri, obligatorie pentru ambele populații;
- *concurența* sau competiția – este o interacțiune cu consecințe negative la populații din aceeași nișă ecologică (o anumită parte, zonă a ecosistemului), care au aceeași sursă de hrană;
- *prădatorismul* – reprezintă relații interspecifice antagonice obligatorii cu efect pozitiv pentru prădător și efect negativ pentru gazdă. Prădătorii sunt factori regulatori ai biocenozelor;
- *parazitismul* – reprezintă interrelația dinte parazit și gazdă în care parazitul folosește gazda ca biotop și sursă de hrană, transferându-i, în detrimentul acesteia, inclusiv rezolvarea reglării relațiilor reciproce și cu mediul înconjurător. Astfel, paraziții devin dependenți biologic și ecologic de alte specii. Parazitismul este extrem de răspândit în lumea animală și vegetală. Poate fi facultativ sau obligatoriu, iar după durată și stadii se poate clasifica în: temporar, staționar, periodic sau permanent. Hiperparazitismul este un dublu parazitism.

22.4. ORGANIZAREA LUMII VII

Lumea vie (biosistemele) se poate defini ca o alcătuire de sisteme deschise a căror principală condiție este schimbul continuu de energie și materie cu mediul înconjurător.

Biosistemele se caracterizează prin durată de existenţă limitată, dar cu capacitate de autoreproducere, ceea ce le asigură probabilitatea de perpetuare nelimitată în timp. Această capacitate de autodezvoltare şi evoluţie a biosistemelor constituie caracterul istoric al acestora, datorită căruia caracterele actuale ale fiecărui organism reprezintă rezultatul acţiunii tuturor factorilor ereditari, genotipul cu condiţiile concrete ale mediului în care a trăit. Lumea vie este organizată în trei mari categorii de sisteme, conform diagramei următoare:



Ordinea în care au fost prezentate aceste sisteme reflectă şi poziţia lor ierarhică pe scara organizării, precum şi raporturile dintre ele.

Aşa cum am precizat încă de la început, obiectul principal de studiu al ecologiei este biocenoza.

22.4.1. Biocenoza

Biocenoza, termen introdus de K. Möbius în anul 1877, este o comunitate, cuprinzând totalitatea speciilor şi a indivizilor, reciproc limitată şi selectată sub acţiunea factorilor de mediu de viaţă, care ocupă un anumit teritoriu (biotop); termenul se referă la ansamblul populaţiilor vegetale şi animale care trăiesc în interdependenţă şi conexiune şi care ocupă un anumit habitat.

Unitatea structurală elementară a biocenozei este organismul individual mono- sau pluricelular. Toate raporturile biotice în biocenoză sunt raporturi între indivizi. Fiecare specie dintr-o biocenoză este reprezentată de mai mulţi indivizi, iar o mulţime de indivizi reprezintă o populaţie.

Raporturile dintre indivizi capătă caracter de masă sau populaţional, iar efectul lor se conjugă. Populaţia ca sumă a indivizilor unei specii constituente a unei biocenoze reprezintă un subsistem în care sunt cuprinse elementele structurale ale biocenozei – organismele.

Principalele caracteristici de grup ale populaţiei sunt:

a) *efectivul populaţiei* – reprezentat de numărul de indivizi din biocenoză. Efectivul este supus fluctuaţiilor provocate de raportul dintre natalitate şi mortalitate. Cauzele fluctuaţiilor pot fi externe – datorită variaţiei factorilor

ecologiei, inclusiv hrana, sau interne – dependente de densitatea indivizilor care acționează ca un factor stresant, declanșând reglaje de comportament sau fiziologice. Populația ca tot organizat, are tendința de a obține prin reglaje interne o așa numită homeostazie, adică un echilibru al parametrilor ei, cu oscilații și fluctuații cât mai reduse;

b) *structura populației* – reprezintă distribuția indivizilor pe vârste, sexe, dimensiuni, precum și caracterul repartiției în cuprinsul biocenozei (izolat sau agregat). Structura se modifică pe baza schimbărilor în raportul vârstelor, sexului etc. Aceste schimbări sunt condiționate de fluctuațiile efectivului care schimbă raportul dintre vârste sau sexe;

c) *dinamica populației* – una din cele mai importante caracteristici ale biocenozei, ce depinde de modificările structurale și de fluctuațiile efectivului;

d) *nișa ecologică* – locul (localizarea teritorială sau spațială), funcția și raporturile populației în ecosistem;

e) *unitatea genetică* a populației – reprezintă schimbul continuu de gene între indivizii ce o compun.

În biocenoză se efectuează un circuit complet al materiei organice, de la sinteza ei din elemente anorganice, până la descompunerea completă și punerea în libertate a acestor elemente.

Legat de circulația materiei și energiei și de conversibilitatea acestora în cadrul unei biocenoze, trebuie subliniat faptul că organismele sunt legate între ele prin raporturi multiple, în primul rând prin raporturi de hrană, denumite și raporturi trofice. În cadrul acestor raporturi trofice, organismele ocupă poziții sau niveluri trofice diferite. Astfel distingem:

1) **Producătorii** – sunt organisme autotrofe, adică își sintetizează singure materia organică din elementele anorganice, mai ales dioxid de carbon (CO_2) și apă (H_2O), alături de o serie de substanțe minerale, în special azot (N), fosfor (P), potasiu (K), calciu (Ca), fier (Fe), magneziu (Mg), sulf (S) etc. Principalii producători sunt plantele verzi, care realizează sinteza prin folosirea energiei solare. Plantele verzi au un rol determinat ca producători deoarece:

– asigură energia și substanțele organice și anorganice necesare tuturor celorlalte organisme din biocenoză;

– pun în mișcare circuitele biocenotice de apă, oxigen, substanțe minerale;

– constituie partea ce intervine cel mai puternic în modificarea complexului de factori ecologici;

– formează scheletul permanent al biocenozei, creând numeroase locuri de viață și adăposturi pentru alte organisme.

2) **Consumatorii** – plantele verzi constituie hrana de bază a organismelor heterotrofe a căror totalitate o constituie consumatorii. Acest mare grup de fiinţe vii se împarte în:

– Consumatorii *primari* sau fitofagi (C I), care se hrănesc cu produse vegetale. Dintre aceşti consumatori menţionăm: virusii, bacteriile, ciupercile; dintre animale, unele protozoare – crustaceele, peştii, păsările; iar dintre mamifere, rozătoarele şi erbivorele.

– Consumatorii *secundari* (C II), care se hrănesc cu fitofage (cum sunt: insecte răpitoare, păsări răpitoare, peşti răpitori, reptile, animale carnivore de talie mică).

– Consumatorii *terţiari* (C III), care sunt carnivore mari, fără duşmani (cum sunt: rechinul, tigrul etc.).

– *Saprofagele* – sunt consumatorii care se hrănesc cu materie organică moartă, pe care însă nu o pot descompune până la stadiul de substanţe minerale.

3) **Descompunătorii** – cuprind toate organismele care degradează materia organică moartă fie direct, fie de la diferiţi consumatori. Dintre acestea, unele ciuperci, actinomicete şi bacterii transformă substanţele organice complexe în produşi mai simpli, iar altele mineralizează aceşti compuşi, adică îi transformă în substanţe minerale simple, CO_2 şi H_2O.

Aceste trei categorii funcţionale de organisme sunt legate între ele prin multiple raporturi, în primul rând prin raporturi de hrană. De exemplu, pentru fiecare producător există unul sau mai mulţi consumatori de ordinul I. Aceştia, la rândul lor, reprezintă hrana pentru consumatorii de ordinul II şi aşa mai departe.

Pe baza acestor raporturi iau naştere adevărate lanţuri trofice, în care fiecare specie participantă reprezintă o verigă sau un nivel trofic. De cele mai multe ori, în biocenoze nu există lanţuri simple deoarece prin anumite verigi lanţurile se pot lega între ele, astfel că, de fapt, biocenoza devine o adevărată reţea de lanţuri trofice.

Configuraţia biocenozelor depinde în mod esenţial de raporturile trofice, care se manifestă prin:

– *prădătorism* – consumul hranei pe baza distrugerii prăzii;

– *parazitism* – consumul hranei prin vătămarea prăzii, dar fără a o distruge;

– *comensualism* – consum fără vătămare şi fără folos pentru organismul producător;

– *cooperare* – consum fără vătămare, dar de folos pentru organismul producător.

Prin raporturile trofice, în biocenoză se realizează un flux continuu de energie, care își are sursa în energia solară fixată în plante sub forma sa chimică și care întreține toate procesele vitale ale organismului de-a lungul lanțurilor trofice. Fluxul energetic se poate exprima fie în calorii, fie în biomasa care trece de la un nivel trofic la altul. Studiul relațiilor dintre nivelurile trofice și ponderea lor specifică a condus la stabilirea regulii conform căreia numărul de indivizi care constituie un nivel, descreşte de la consumatorii primari spre cei terțiari. De regulă, fluxul energetic scade cu câte un ordin de mărime atunci când se trece de la un nivel trofic la cel imediat superior.

Prin generalizarea acestor observații, Charles Elton a elaborat încă din 1927 un model geometric în care se demonstrează că structura trofică a biocenozelor se dispune ca o piramidă în care, de la bază spre vârf, se plasează descrescător ca pondere numerică producătorii, urmați de toate categoriile de consumatori, așa cum se observă în figura 22.2. Piramida trofică poate avea forme diferite, în funcție de natura biocenozei.

Procesul principal care condiționează existența biocenozei și asigură menținerea individualității ei este procesul de producere, consum și descompunere a biomasei, adică procesul de *producție ecologică*.

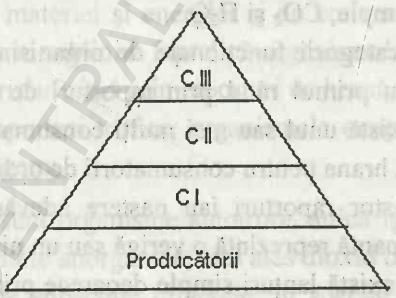


Fig. 22.2. Piramida trofică eltoniană.

Biomasa reprezintă totalitatea masei de substanță organică cuprinsă în organismele vii ale populației unui nivel trofic, ale biocenozei la un moment dat. Biomasa poartă și numele de *producție* sau *productivitate* și se exprimă în g/m^2 sau t/ha.

Necromasa reprezintă toată masa de substanță organică moartă existentă într-o biocenoză. Se disting:

- *producția primară*, ce provine de la organismele autotrofe;
- *producția secundară*, ce provine de la organismele heterotrofe.

22.4.4. Ecosistemul

Ecosistemul reprezintă rezultatul interacţiunii dintre elementele vii şi cele anorganice dintr-un anumit mediu de viaţă şi teritoriu geografic.

Ecosistemul este un sistem organizat care se distinge prin diferenţierea părţilor componente şi interacţiunea dintre acestea. Din punct de vedere al organizării ecosistemului, obiectul de studiu îl constituie: părţile componente ale ecosistemului, structura ecosistemului, funcţia ecosistemului.

22.4.4.1. Părţile ecosistemului

Ecosistemul este format din două subsisteme interdependente.

I. **Componenta nevie, anorganică a naturii**, denumită **habitat**, care reprezintă sursa primară majoră a formelor de energie şi materie pentru procesele biologice. Habitatul este reprezentat prin substrat şi microclimat, la nivelul cărora se desfăşoară procesele mecanice, fizice şi chimice.

1) ***Substratul*** (suportul material al viului) cuprinde elemente din principalele medii de viaţă de pe Terra:

- *litosfera* (roca, solul, depozit de apă) – se caracterizează prin structuri tectonice, aspecte geomorfologice şi condiţii fizice şi chimice variate, exprimate în dinamica terestră;
- *hidrosfera* – masa de apă din oceane, mări, lacuri şi râuri – este substrat pentru forme variate de viaţă; reprezintă o cale de migraţie a elementelor biogene; favorizează ciclurile geochimice şi ciclul hidrologic care transformă scoarţa şi furnizează viului elemente chimice;
- *atmosfera* – are un rol redus ca suport al viului; este mediul respirator, sursa de CO_2 şi H_2O, vehicul reglator al energiei radiante, mediu de răspândire a vieţii (seminţe, fructe, virusuri), mediu de eliberare a unor produşi din procese biologice (evapotranspiraţia);

2) ***Microclimatul***, sau clima locală, este caracterizat prin:

- lungimea zilei;
- iradierea solară;
- regimul de temperatură;
- distribuţia vântului, umiditatea atmosferică, precipitaţii, rata evaporării, presiune atmosferică.

BCUAS-CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II. **Componenta biologică a ecosistemului** este biocenoza, care este constituită din totalitatea microorganismelor şi macroorganismelor vegetale şi animale care realizează între ele multiple şi complexe relaţii inter- şi intraspecifice.

22.4.4.2. Structura ecosistemului

Se iau în considerare elementele ce descriu trăsături ale biocenozei, habitatului şi ale grupărilor de biocenoză şi biotopuri, şi anume:

1) *elementele structurale ale biocenozei:*
   - proporţia numerică dintre specii;
   - numărul şi densitatea indivizilor şi speciilor;
   - biomasa speciilor;
   - repartiţia spaţială a populaţiilor cu caracter dominant;
   - dinamica biomasei într-un ciclu ecologic anual;
2) *elementele structurale ale habitatului:*
   - natura şi dinamica factorilor chimici;
   - natura şi dinamica factorilor fizici;
   - natura şi dinamica substratului;
3) *elementele structurale ale grupărilor biotice:*
   - diversitatea biomaselor şi habitatelor;
   - raportul spaţial al biocenozelor şi al biotopurilor (pe verticală şi pe orizontală);
   - dinamica raporturilor dintre ecosistem şi ambianţă în cadrul unui ciclu anual.

22.4.4.3. Funcţiile ecosistemului

Funcţiile ecosistemului sunt legate mai ales de componenta care are ca rol principal concentrarea de materie şi energie din mediul ambiant sub formă de biomasă şi, de asemenea, de a creşte gradul de organizare a sistemului ecologic. Funcţiile ecosistemelor includ mai ales:

1) **transferul sau fluxul de energie prin ecosistem,** adică absorbţia fotonilor, încorporarea cuantelor de energie în cloroplaste, transmiterea energiei de la clorofilă la sistemul de reacţie CO_2 şi H_2O, transmiterea energiei la heterotrofe, împrăştierea energiei în ecosistem, degradarea energiei şi transformarea ei în căldură, stabilirea balanţei energetice. Se urmăreşte stabilirea eficienţei utilizării energiei în ecosistem;

2) **transferul sau circulaţia materiei prin microcicluri biogeochimice,** adică producerea şi transformarea substanţei organice în ecosistem se realizează în etape:

a) sinteza primară de materie organică de către organismele autotrofe;

b) transformarea materiei organice primare de către organismele heterotrofe;

c) descompunerea materiei organice de către descompunătorii microbiotici în substanţe minerale.

Importanţa studiilor privind ecosistemele rezidă mai ales în aceea că aceste studii se referă la o necesitate practică umană, mai ales prin:

– cunoaşterea mecanismelor care condiţionează producţia biologică şi în mod specific recolta;

– folosirea metodelor pentru dirijarea productivităţii biologice;

– stabilirea de criterii pentru organizarea şi exploatarea agrobiocenozelor;

– constituie baza pentru organizarea sistemelor antropice pentru protecţia mediului.

22.5. SISTEMELE VII CA STRUCTURI DISIPATIVE

Sistemele vii constituite în structuri înalt organizate reprezintă o tendinţă de îndepărtare de echilibru şi dezordine. Erwin Schrodinger a încercat într-o lucrare celebră să prezinte unitar procesele fundamentale ale biologiei, fizicii şi chimiei, plecând de la observaţia că viaţa este alcătuită din două procese fundamentale: *ordine din ordine* şi *ordine din dezordine*. Schrodinger a observat că genele generează ordine din ordine în specii, adică progeniturile moşteneau trăsăturile părinţilor. Cea de a doua observaţie a lui Schrodinger, extrem de şocantă şi puţin înţeleasă, a fost elaborată prin efortul său de a lega biologia de teoremele fundamentale ale termodinamicii. El a observat că sistemele vii par a contrazice principiul al doilea al termodinamicii, care postulează faptul că în sistemele închise, entropia sistemului tinde la valoarea ei maximă; dar sistemele vii sunt extrem de organizate. Ele prezintă niveluri de extraordinară ordine creată din dezordine. De exemplu, plantele sunt structuri înalt ordonate, dar ele sunt sintetizate din atomi dezordonaţi şi molecule absorbite din gazele atmosferice şi sol. Schrodinger rezolva această aparentă neconcordanţă prin termodinamica neechilibrului, observând că sistemele vii există într-o lume a energiei şi fluxurilor de substanţă şi energie. Un organism, un sistem înalt organizat ia energie din exterior şi o prelucrează, producând în interiorul său o stare mai organizată. Viaţa este un sistem de neechilibru, care îşi menţine nivelul de organizare pe seama bugetului de entropie mult mai mare la nivel global, emiţând astfel ideea că

autoorganizarea biologică poate fi armonizată cu termodinamica prin studiul sistemelor vii din perspectiva neechilibrului.

Aceste concepții ale lui Schrodinger au fost exprimate concis de Boltzmann încă din 1886 în felul următor:

Lupta generală pentru existență a viețuitoarelor nu este deci o luptă pentru materiale brute – acestea sunt pentru organisme aerul, apa și solul –, toate disponibile din abundență, nici pentru energia care se găsește din plin în fiecare corp sub formă de căldură – cu toate că, din nefericire, este netransformabilă –, ci este o luptă pentru entropie, care devine disponibilă prin transferul de energie de la soarele fierbinte la pământul rece.

Cu alte cuvinte, un organism rămâne viu – departe de entropia maximă a morții – în starea sa superior organizată primind energie de înaltă calitate din exterior, pe care o degradează pentru a sprijini structura organizată a sistemului.

Deci, în concluzie viața poate fi considerată o structură disipativă departe de echilibru, care își menține nivelul local de autoorganizare pe cheltuiala producerii de entropie în mediu. Originea vieții poate fi considerată ca fiind o altă cale de disipare a uriașilor gradienți energetici, iar creșterea biologică apare atunci când sistemul își mărește posibilitățile de degradare a gradienților. Creșterea plantei este o încercare de a capta energia solară și de a disipa gradienții utilizabili. De exemplu, plante din mai multe specii se organizează în ansambluri pentru a mări suprafața de frunze și a optimiza captarea energiei.

22.6. ECOLOGIA ANTROPOSFEREI

Concepția antropică pe plan ecologic, economic și politic a fost declanșată de criza poluării mediului, epuizării resurselor naturale, diminuării relative a hranei, urbanizării și industrializării nearmonizate cu restul dezvoltării ecosistemelor naturale care au generat dezechilibre și au obligat omul la noi acțiuni pentru supraviețuire.

Această nouă situație a condus la ideea că antroposfera trebuie organizată pe principii ecologice. Integrarea omului cu natura este o etapă finală a procesului de ecologizare, exprimat de conceptul de calitate a vieții, care reprezintă totalitatea condițiilor naturale și culturale, de viață, cantitatea și calitatea bunurilor și serviciilor aflate la dispoziția tuturor membrilor societăților umane.

Astfel, conceptul de calitate a vieții se leagă de civilizație, de creșterea economică, de tehnologie și de dezvoltarea industrial-urbană.

22.6.1. Ecosisteme antropice

Ecosistemul cuprinde biocenoza și biotopul. În cazul ecosistemelor antropice, ființele vii sunt constituite numai din oameni, iar biotopul din toate celelalte componente ale mediului înconjurător.

Biotopul, în cazul ecosistemelor antropice, își extinde sfera de obținere a bunurilor necesare dezvoltării vieții în mod global la întreaga planetă.

Funcția de organizare rațională, mai ales prin tehnologie, economie și politică, a condus la constituirea unei singure unități planetare a habitatului uman.

Factorii principali ai acestui habitat global sunt: solul, subsolul, apa dulce și sărată, aerul și energia solară.

Tot ce intervine în reducerea sau conservarea acestor factori fundamentali amenință sau susține și protejează ecosistemul antropic.

Termenul de ecosistem a fost utilizat și pentru populațiile umane. Ecosistemele antropice sunt complexe alcătuite din elemente naturale, artificiale și sociale care condiționează viața, dezvoltarea și confortul individual.

Mediul artificial al omului constă din locuința cu microclimat puțin influențat de cel exterior, de loc de muncă confortabil și spații adecvate pentru relaxare.

Schema generală a ecosistemelor antropice include:

1) *ecosistemul individual și familial* – cu rolul fundamental al locuinței pentru desfășurarea vieții confortabile a membrilor familiei;

2) *ecosistemul local* – localitatea – cu îndeplinirea unor funcții comune pentru membrii colectivității, cu scopul realizării unei calități înalte a vieții indivizilor;

3) *ecosistemul regional și național*;

4) *ecosistemul global.*

Studiul ecologic al sistemelor național și global este de importanță crucială pentru asigurarea unei înalte calități a vieții pentru întreaga planetă.

22.6.1.1. Particularitățile ecologiei antropice

Ecologia antropică este constituită dintr-o parte generală, care preia obiectele științei ce vizează evoluția biologică a populațiilor umane, incluzând însă și influențele sociale și culturale.

Astfel, factorii importanți pentru habitatul uman sunt:

a) *suprafața Terrei* – cu stratul agricol în continuă reciclare și suportul său, complexul biogeochimic, solul propriu-zis;

b) *subsolul* – care cuprinde sursa de minerale utile, ca şi sursa de energie fosilă;

c) *apa utilă* – apa dulce, în cantitate infimă, sub 1% din apa planetară din mările şi oceanele care acoperă 2/3 din suprafaţa globului;

d) *gazele vieţii* – oxigenul, necesar tuturor vieţuitoarelor, azotul, care constituie materialul plastic al vieţii, şi dioxidul de carbon, substanţa care se integrează în viaţă prin fotosinteză;

e) *energia solară* – care, direct sau indirect (prin fotosinteză), asigură energia şi hrana ecosferei.

22.6.1.2. Lanţurile trofice şi piramida Elton la om

Omul este ultima verigă în numeroase lanţuri trofice, nedepinzând însă în mod obligatoriu de nici un lanţ, deoarece are posibilitatea de a se hrăni omnivor, inclusiv cu alimente sintetice. În funcţie de condiţiile climatice regionale şi de posibilităţile de dezvoltare a speciilor, populaţiile umane pot să difere din punct de vedere al alimentaţiei. În prezent, omul nu mai este legat de producţia locală de hrană, ci poate să transporte alimente din toată lumea şi, de asemenea, poate să cultive sau să crească specii transplantate din alte locuri de origine.

Sănătatea omului nu se resimte de pe urma particularităţilor structurii lanţurilor trofice naturale, atunci când acestea pot fi dirijate în sens pozitiv.

Însă atunci când prin lanţurile trofice se pot favoriza concentrări de substanţe nocive, care ajung în final la om (substanţe radioactive, metale grele), starea de sănătate este serios periclitată.

În ceea ce priveşte structura piramidelor eltoniene, omul se găseşte în vârful acestora, fie că este vorba de un număr de indivizi, de cantitatea de biomasă sau de energie.

22.6.1.3. Coordonatele demografice ale ecologiei antropice

La populaţia umană nu se poate aplica legea plafonării creşterii în funcţie de posibilităţile oferite de mediu. În mare măsură, dinamica unei populaţii depinde de comportamentul demografic, care depinde de factorii economici, alimentari, culturali, tehnologici etc.

Numărul populaţiei depinde şi de durata de supravieţuire. Omul prezintă o curbă de supravieţuire de formă convexă, durata vieţii fiind aproximativ aceeaşi pentru cea mai mare parte a indivizilor, iar moartea survine astăzi pe un interval redus (65–80 ani). Curba de supravieţuire a omului a evoluat istoric, de la forma concavă spre forma convexă.

22.6.2. Problema resurselor naturale

Resursele de viaţă reprezintă o mare problemă ecologică contemporană cu importante consecinţe asupra ecosistemului global prin perspectiva epuizării lor.

Principalele resurse naturale de energie şi materie sunt următoarele:

a) **Energia solară**, care stă la originea vieţii pe Pământ şi a majorităţii fenomenelor ce întreţin fiinţele vii.

Aşa cum se prezintă în numeroase date statistice, conform Barnea soarele constituie principala sursă de energie, ce asigură ciclul organic. Energia solară este de 5^{20} kcal/an, din care o parte se transformă în celuloză şi amidon, în cadrul procesului de fotosinteză. Prin acest proces se fixează anual aproximativ 175 miliarde tone bioxid de carbon şi se generează 400 miliarde tone oxigen.

b) **Vegetaţia globului**, care constituie un factor important pentru ecosistemele antropice, datorită multiplelor funcţii pe care le îndeplineşte.

Cel mai important rol constă în fixarea energiei solare şi introducerea ei în ciclul biosferei, sub forma carbonului organic, în special sub formă de celuloză şi amidon.

Vegetaţia globului este sursa de oxigen pentru restul vieţuitoarelor. Din cantitatea de oxigen necesară pentru respiraţie aproximativ două treimi este generată de plantele terestre, iar cealaltă treime de planctonul acvativ. De aceea, între înmulţirea populaţiei umane şi reproducerea vegetaţiei se stabileşte o relaţie inversă, împotriva echilibrului ecologic.

Un hectar de teren împădurit absoarbe anual, din atmosferă, 7 milioane tone CO_2 şi redă în atmosferă 2 milioane tone O_2.

Un alt rol al pădurii constă în asigurarea climei, asigurarea fertilităţii solului, protecţia împotriva inundaţiilor, dirijarea apei prin rădăcini spre diferite straturi ale solului, protecţia împotriva vântului, zăpezii şi viscolului etc. Pădurea asigură o protecţie împotriva poluării cu pulberi şi gaze, a poluării sonore, a contaminării cu microorganisme etc.

Pădurile acoperă în prezent circa 30% din suprafaţa uscatului, exercitând acţiuni pe ansamblul planetei, dar şi limitat, la nivel continental, regional şi local.

c) **Solul.** Dezvoltarea populaţiei umane este legată de asigurarea hranei într-un sistem reciclabil, în cadrul unui agroecosistem, al cărui suport este solul.

În cadrul agroecosistemelor, omul şi-a creat baza unei alimentaţii produse de el însuşi, cvasiindependent de natură.

Suprafața agricolă care revine în medie unui om diferă după țară, datorită înmulțirii și distribuției inegale a populației umane pe glob, ca și productivității, ce depinde atât de natura terenului, cât și de modul de cultivare a solului.

Pământul nu este însă suficient exploatat și nu a fost desțelenit decât parțial, suprafața totală cultivată pe glob reprezentând doar 11% din totalul uscatului.

d) **Resursele minerale**, care, folosite la construcția de mașini și utilaje, locuințe, îmbrăcăminte etc., prezintă o importanță deosebită pentru păstrarea și promovarea echilibrelor ecosistemelor umane. Rezervele cunoscute sunt mari pentru majoritatea acestor resurse, dar unele au perspective de utilizare secular, în timp ce altele se vor epuiza în câteva decenii. Astfel:

Fierul, produs în cantitate mare, se va epuiza probabil la consumul actual, în 250 de ani.

Pentru *aluminiu* durata de exploatare estimată la 250–300 ani.

Durată scurtă de exploatare mai este prevăzută la cupru, zinc, plumb nichel, crom, cobalt, mangan, mercur, molibden, wolfram, argint și aur.

Exploatarea minereurilor metalifere din mări și oceane, unde există atât dizolvate în apă, cât și depuse pe fund, sub formă de noduli, bogați mai ales în mangan, molibden, magneziu, uraniu, cositor și cobalt, nichel, cupru, aluminiu, fier, zinc, reprezintă o sursă de materiale în viitor.

22.6.3. Ciclurile materiei

Ciclurile materiei și regenerările sale stau la baza echilibrelor ecosistemelor în general și, deci, și a ecosistemelor antropice. Numeroase activități umane pot influența circuitul materiei prin scăderea sau creșterea unuia dintre procesele care mențin echilibrul sau prin poluare.

Ciclurile cele mai importante pentru om sunt cele referitoare la substanțele și elementele biogene, ca apa, oxigenul, carbonul, azotul, dioxidul de carbon, sulful, fosforul. Cu cât consumul de către om a unora dintre aceste substanțe este mai ridicat, cu atât se ridică probleme mai mari pentru ecologia antropică.

Oxigenul, produs de biomasa vegetală și consumat prin oxidări bio- și geochimice sau prin procese industriale și tehnice, poate prezenta un dezechilibru ecologic prin consum excesiv, dar până în prezent, deoarece durata de reciclare este mare (2000 ani), acest lucru nu este posibil. Problema diminuării producerii de oxigen se pune pentru fitoplancton și pentru pădurile zonelor tropicale, marile surse de oxigen ale lumii, care contribuie în proporții diferite la generarea sa și care sunt degradate în mod excesiv.

Azotul are un ciclu foarte lung – 400 milioane de ani –, producerea sa realizându-se din procese bio- și geochimice, iar consumul prin fixare microbiană. Cantitatea enormă de azot din aer și consumul relativ lent nu pun probleme de epuizare.

Dioxidul de carbon, generat în mod natural prin procese geo- și hidrochimice, este produs în exces în epoca contemporană prin arderea combustibililor, ceea ce îi dereglează echilibrul. Având ciclul cel mai scurt pentru reciclarea întregii cantități din atmosferă (300 ani), riscul de dezechilibrare este apreciabil.

Carbonul se găsește în principal în aer și sol, de unde ajunge în viețuitoare, cu ajutorul energiei solare. El participă la ciclul energiei prin folosirea cantităților depozitate în plantele fosile.

Fosforul este un element necesar vieții, fiind utilizat mai des ca îngrășământ. Se găsește relativ puțin în sol, în sedimente de roci fosfatice. Spălat de ape, ajunge și în bazinele de apă stătătoare, unde produce eutrofizarea acestora.

Sulful, prin acumularea sa în atmosferă sub formă de SO_2, care crește cu circa 5% pe an, reprezintă o gravă problemă de poluare. Sub formă de sulfați, intră în ciclul biologic al bacteriilor etc. și apoi în compoziția hranei animalelor superioare și a omului. Există sub forma de zăcăminte în cantități mari, la care se adaugă circa 1,25 miliarde tone ca sulfați în apa de mare. O parte din sulfați se poate reduce la hidrogen sulfurat. La ciclul sulfului contribuie bacteriile sulfuroase și, apoi, metabolismul plantelor și animalelor, care-l transformă în compuși organici utili unora dintre ele, inclusiv omului.

22.7. INTERDEPENDENȚA ANTROPOSFERĂ–MEDIU

22.7.1. Schimbul de materie și energie dintre om și mediu

Spre deosebire de alte ființe omul manifestă cea mai mare autonomie față de mediu; el își construiește cadrul material de viață, iar habitatele umane diferă mult de cele naturale, fiind realizate după dorința și gradul de evoluție.

Particularitatea habitatelor umane constă în includerea în componența lor, pe lângă elementele naturale, a unor elemente artificiale – ambele influențând în mod substanțial viața.

22.7.2. Agenți ai mediului

Prin evoluția sa, omul a completat continuu mediul său înconjurător. De aceea, o analiză a interdependenței om–mediu are o importanță particulară din punct de vedere ecologic.

Păstrând clasificarea simplă a agenților mediului în trei categorii – fizici, chimici și biologici – se poate face o evaluare a rolului lor pentru organismul uman.

22.7.2.1. Agenții fizici

Agenții fizici sunt reprezentați de spațiu, de obiectele și energiile existente în proximitatea omului și care-l pot influența. Pe primul loc se situează energia calorică înglobată în obiecte, din care o parte este cedată în spațiu și cu care organismul uman stabilește relații de schimb sub forma căldurii și a termoreglării.

Spațiul a devenit important mai ales în epoca modernă. În spațiile închise și în marile aglomerări urbane începe, însă, să se resimtă acut influența spațiului datorită atât creșterii demografice, cât și scăderii sale relative prin creșterea vitezelor mijloacelor de transport.

Spațiul este multidimensional și se caracterizează prin următorii parametri:

a) *spațiali* – lungime, lățime, înălțime;

b) *temporali* – timp evolutiv, ciclic, fiziologic, psihic;

c) *potențiali* – câmpul electric magnetic, gravitațional, nuclear, biotic;

d) *particular* sau *discontinuu* – densitate, infraparticule, atomi, ioni, molecule etc.;

e) *amorfi* – temperatură, termogeneză, entropie, presiuni, entalpie etc.;

f) *informaționali, structurali* – negentropie, integrare, forme cristaline, biotice, psihice, sociale, homeostazii.

Sănătatea psihică și cea fizică depind de corelațiile omului cu spațiul și timpul. Comprimarea spațiului în care trăiește omul de azi are loc prin diminuarea peisajului și a perspectivei, prin creșterea vitezei.

Aglomerația ca factor fizic devine generatoare de îmbolnăviri, de exemplu: în instituții publice, în mijloacele de transport, în locurile unde se distribuie bunuri materiale sau spirituale.

Timpul constituie un factor important pentru ecologia antropică.

Omul este dependent de timp în cadrul variatelor sale aspecte: fizic, astronomic, biologic și psihologic.

Timpul fizic constituie aspectul de referinţă, timpul obiectiv, la care se raportează, în final, toate celelalte forme de timp.

Timpul astronomic este cel care afectează direct omul în cele mai multe procese biologice, el fiind fragmentat în intervalul unei zile, unei luni, an. Fiind legat în principal de soare, numeroase fenomene biologice sunt influenţate de ritmicitatea cosmică, astfel încât timpul şi ritmurile astronomice sunt şi factorii generatori ai bioritmului omului.

Bioritmurile omului caracterizează starea sa de sănătate şi de boală şi influenţează manifestările sale majore: forţa fizică, reproducerea speciei, capacitatea de creaţie.

Timpul biologic se referă la intervalele şi frecvenţele de desfăşurare a unor procese din organism: creşterea, înlocuirea celulelor, repararea ţesuturilor, care depind de specie, vârstă, organ etc.

Rolul factorului timp asupra omului este imens şi adaptarea la timp este o funcţie care priveşte nu numai individul, ci şi ecologia antropică, ansamblul elementelor şi sistemelor care o compun.

Radiaţiile şi fenomenele ondulatorii. Mediul înconjurător este străbătut de radiaţii cu diferite lungimi de undă, proprietăţi fizice şi efecte biologice.

Cele mai însemnate pentru om sunt radiaţiile calorice, luminoase, ultraviolete şi ionizante; lor li se adaugă undele mecanice, fenomene electrice, magnetice etc. Acestea îşi au originea în mediul natural şi în condiţiile artificiale de viaţă.

Importanţa fenomenelor ondulatorii asupra organismelor vii este covârşitoare, deoarece viaţa nu se poate dispensa de ele. Condiţiile de viaţă şi de muncă modifică raporturile cu aceşti factori, devenind necesară corectarea lor în vederea protecţiei organismului uman.

Influenţa radiaţiilor şi a celorlalte fenomene ondulatorii se exercită fie direct asupra diferitelor componente anatomofuncţionale ale corpului uman, fie asupra ansamblului său prin intermediul organelor de simţ, care sunt aparate de recepţie, relaţie şi informaţie privind caracteristicile mediului.

Influenţa radiaţiilor şi a celorlalte fenomene ondulatorii este deosebit de importantă pentru antroposferă prin modificările pe care le determină asupra factorilor de mediu de natură abiotică sau biotică. Radiaţiile condiţionează clima, cele luminoase şi ultraviolete dezvoltarea plantelor şi distrugerea bacteriilor etc.

Radiaţiile existente se constituie într-o anumită ambianţă energetică, pe seama căreia devine posibilă viaţa

Astfel, radiaţiile sunt utilizate prin acţiune directă de către celulele şi organele cu care vin în contact sau acţionează indirect prin convertirea energiilor în altă formă de energie şi prin înmagazinarea ei în produşi chimici şi biologici.

22.7.2.2. Agenții chimici

Compoziția chimică a organismului. Componentele chimice ale mediului intră în compoziția corpului omenesc și îi furnizează energia.

Substanțele chimice prezintă importanță pentru antroposferă prin:

a) folosirea lor directă în scopul nevoilor biologice;

b) producerea altor categorii de bunuri: unelte, adăpost, îmbrăcăminte, energie etc.

Dacă prima categorie de elemente este folosită economic, a doua reprezintă de obicei o mare risipă materială, producând poluarea mediului cu substanțe chimice în exces și cu substanțe străine inutile sau nocive biologic pentru om sau animale. Dintre cele 100 elemente chimice cunoscute, doar aproximativ 20 se consideră că au un rol biologic. Acestea se pot grupa în mai multe categorii, și anume:

a) macroelemente biogene primordiale, care ajung în organism prin apă, aer și alimente și sunt caracteristice vieții: hidrogen, oxigen, carbon și azot;

b) macroelemente utilizate în cantități moderate și având o repartiție mai limitată, în anumite organe sau sisteme funcționale: Na, K, Cl, Ca, P, Mg, S și Fe;

c) elementele aflate în organism în concentrații mici (oligoelemente) – Cu, Co, Mo, Zn, I, F, Se, Mn, Cr –, având unele funcții esențiale bine cunoscute;

d) în afară de elementele biogene, unele elemente sunt găsite constant sau frecvent în organism, în cantități variabile; despre ele nu se cunoaște nici cantitatea necesară, nici funcția fiziologică. Cele mai cunoscute sunt: Al, Ag, As, Ba, Bo, Br, Cd, Hg, Li, Ni, Pb, Sb, Si și Sn, dar li se pot adăuga și altele. Acestea, ca și altele, pot determina, în anumite concentrații, efecte toxice, nocive, atât ca elemente, cât și sub formă de compuși.

Necesarul de substanțe minerale al organismului uman este tot atât de mare ca și acela de substanțe organice, ele având un rol atât în structura organelor, cât și pentru asigurarea echilibrului hidric, a echilibrului acidobazic, pentru funcția de conductibilitate și conductilitate neuromusculară.

e) Un mare număr de substanțe, prezente în organism în concentrații mici – F, Co, Mo etc. –, pot produce atât în exces, cât și prin carență, unele boli.

Clasificarea agenților chimici ai mediului, din punct de vedere ecologic, se poate face după mai multe criterii, cum sunt: după originea lor – factori chimici naturali și artificiali; după acțiunea asupra organismului – factori pozitivi și negativi; după natura lor – organici și anorganici; după starea de agregare, în gaze, solide și lichide – ceea ce definește calea de pătrundere în organism, respiratorie, digestivă, cutanată; după mediul din care provin: atmosfera – oxigenul, azotul și dioxidul de carbon; hidrosfera – apa potabilă și componenții săi; solul și

subsolul – numeroase substanţe solide şi în parte apa; alimentele – mai ales substanţele organice etc.

Efectele substanţelor chimice se ierarhizează ca importanţă. Unele au importanţă minoră, sunt rare sau nu interesează viaţa sau organismul uman. Dintre acestea fac parte unele elemente minerale, ca gazele rare etc., precum şi numeroase substanţe organice. Dintre cele importante pentru organism, unele nu ridică probleme deosebite din punct de vedere ecologic (de exemplu: Ca, P, Na etc.), în timp ce altele, ca Pb, Hg, Cd etc. sau O_2, O_3, şi CO_2, precum şi substanţele biocide, cancerigene şi radioactive, ridică mari probleme de poluare.

În relaţia organism–mediu se includ efecte considerate grave, de ordin genetic, sub formă de mutaţii. Aceste efecte sunt atribuite agenţilor chimici toxici, radiaţiilor ionizante şi virusurilor.

22.7.2.3. Agenţii biologici

Vieţuitoarele constituie o parte importantă a mediului de viaţă al omului, condiţionându-i sănătatea şi existenţa, datorită prezenţei şi acţiunii lor directe şi indirecte. Dintre acestea, microorganismele constituie factori biologici ai mediului, pe care îl completează şi îl echilibrează sau îl modifică în funcţie de natura, numărul şi caracterele lor, de raporturile cu populaţia umană, de acţiunile exercitate asupra factorilor de mediu.

Microorganismele reprezintă clasa de organisme compusă din virusuri, bacterii şi fungi, care participă la transformarea şi menţinerea dinamicii ciclurilor materiei, îndeosebi în apă şi în sol. Unele pot ajunge şi în ţesuturile vii, producând parazitarea, îmbolnăvirea şi chiar moartea vieţuitoarelor.

Microorganismele se găsesc în mediu, în număr proporţional cu suportul material de dezvoltare şi cu condiţiile de supravieţuire.

Bacteriile sunt microorganisme monocelulare cu structură şi funcţii complexe, cu capacităţi de adaptare variate, unele morfologice (spori, capsule etc.), altele biochimice.

Bacteriile sunt de mai multe categorii: autotrofe şi heterotrofe; saprofite şi parazite; aerobe şi anaerobe etc. Unele bacterii din mediu efectuează transformarea substanţelor organice în substanţe minerale precum şi o serie de alte transformări biochimice.

Numărul bacteriilor şi varietatea speciilor sunt dependente de resursele de viaţă şi de condiţiile de dezvoltare şi, de aceea, în colectivităţile umane se găsesc un număr mai mare de bacterii şi de specii, dintre care multe microorganisme patogene.

O serie de boli microbiene sunt transmise prin insecte, căpuşe, rozătoare, animale domestice.

Bacteriile sunt folosite pentru descompunerea poluanților din compoziția reziduurilor solide şi a apelor uzate. Culturi selecționate de bacterii au început să fie folosite ca mijloace de descompunere rapidă a unor reziduuri solide şi lichide urbane, a celor petroliere etc. Bacteriile selecționate genetic sunt folosite în prezent şi pentru distrugerea dăunătorilor.

Protozoarele, viermii şi alte nevertebrate inferioare exercită o serie de funcții în ecosisteme. Protozoarele intervin în limitarea şi restabilirea numărului normal de bacterii dintr-un mediu în care, anterior, de exemplu datorită poluării organice, numărul bacteriilor a fost foarte mare.

Între protozoare şi viermi există unele specii parazite, care pot infesta omul şi animalele, provocând îmbolnăviri.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

23. COMPUŞI FITOCHIMICI INDUSTRIALI: ABORDĂRI BIOTEHNOLOGICE

23.1. PLANTELE – SURSE CONSACRATE DE COMPUŞI FARMACEUTICI, AROMATICI ŞI INDUSTRIALI

Civilizaţia este indisolubil legată de lumea plantelor, acestea constituind de milenii sursa majoră de obţinere a unor bioproduse esenţiale pentru supravieţuirea întregului regn animal. Domesticirea plantelor şi dezvoltarea unor practici corelate precum selecţia, ameliorarea şi procesarea produselor vegetale sunt consecinţa directă a faptului că de organismele fotosintetice, care sunt producătorii primari ai planetei, depinde existenţa tuturor consumatorilor din lanţurile trofice. De aceea chiar şi stabilitatea civilizaţiilor a fost adesea condiţionată de relaţia dintre oameni şi plante.

Adevărate uzine biochimice acţionate de energia solară, plantele sintetizează nu numai compuşii de bază necesari supravieţuirii lor, din categoria hidraţilor de carbon, proteinelor şi lipidelor, ci şi o gamă largă de substanţe organice extractibile în cantităţi suficiente pentru a prezenta importanţă semnificativă ca materii prime cu variate aplicaţii ştiinţifice, tehnologice şi comerciale. Natura a creat o diversitate enormă pe parcursul evoluţiei, iar zestrea botanică a planetei stochează şi în prezent numeroase resurse încă insuficient cunoscute, care pot reprezenta alternative rentabile pentru obţinerea unor materii prime deficitare în diferite domenii economice. În consecinţă regnul vegetal continuă să reprezinte principalul furnizor de compuşi fitochimici utilizaţi în diferite ramuri industriale cum sunt cele ale produselor farmaceutice, alimentare, cosmetice, agrochimice, cu valori comerciale exprimate în miliarde de dolari. Plantele constituie surse de neînlocuit pentru uleiuri industriale (volatile şi fixe), arome, parfumuri, răşini, gume hidrocoloidale, saponine şi alţi surfactanţi, coloranţi, pesticide, cauciuc natural, substanţe medicamentoase şi mulţi alţi compuşi speciali.

Fitochimicalele cele mai cunoscute includ medicamente ca morfina şi codeina (alcaloizi analgezici derivaţi din latexul de la *Papaver somniferum*), cocaina (alcaloid anestetic local derivat din frunze de coca), chinina (alcaloid antimalaric derivat din scoarţă de Cinchona), curare şi digitalina; parfumuri şi esenţe ca uleiul de trandafir şi jasminul; materii prime industriale ca acizi graşi, ulei de pin şi cauciuc natural; pesticide ca piretrinele şi nicotina (fig. 23.1).

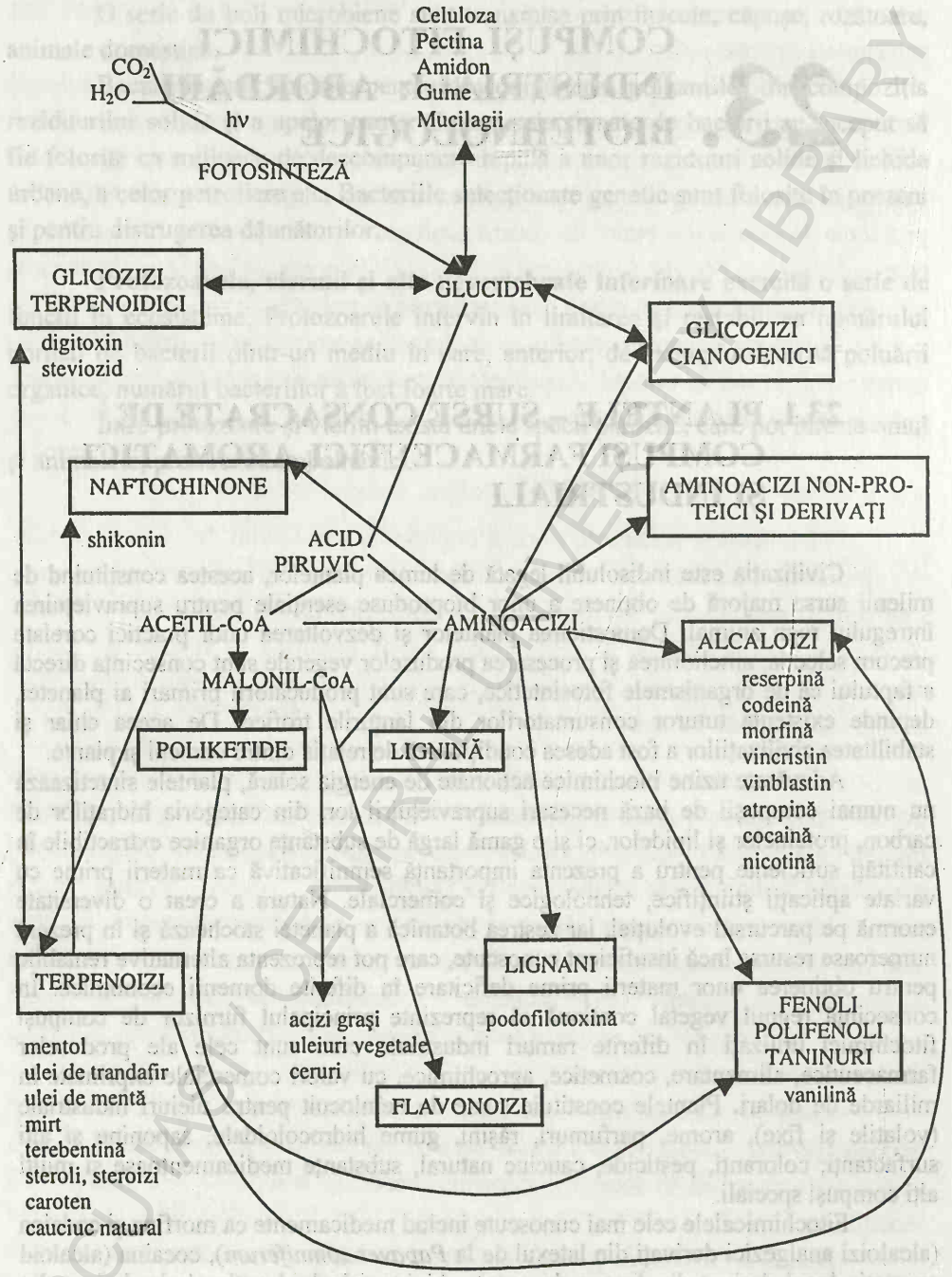


Fig. 23.1. Originea biosintetică a unor compuși vegetali (grupele majore de metaboliți secundari sunt încadrate în chenare) (după M. F. Balandrin și colab. 1985).

Chiar dacă până în prezent au fost descrise numai 250 000 de specii vegetale din cele 500 000 estimate ca existente pe planetă, statisticile recente evidenţiază faptul că peste 1500 de compuşi noi sunt identificaţi anual în diferite specii de plante şi că aproximativ un sfert dintre medicamentele prescrise conţin substanţe de origine vegetală. Totodată rapiditatea procesului de extincţie a speciilor şi de îngustare a bazei genetice a resurselor vegetale în lume a stimulat atât reconsiderarea importanţei vitale a resurselor genetice cât şi interesul pentru obţinerea metaboliţilor de interes prin metode neconvenţionale.

23.2. SEMNIFICAŢIA BIOLOGICĂ A METABOLIŢILOR PRIMARI ŞI SECUNDARI

Putem spune că într-o celulă vegetală vie, substanţa cea mai abundentă este apa, întrucât aceasta reprezintă aproximativ 70% din greutatea celulei, fapt explicabil prin aceea că majoritatea reacţiilor intracelulare au loc în mediu apos. Celulele mai conţin însă şi multe alte substanţe, în primul rând 4 familii majore de molecule organice mici: glucide, acizi graşi, aminoacizi şi nucleotide.

Metabolismul constă din serii strâns coordonate de reacţii chimice mediate de enzime care se desfăşoară în cadrul organismului vegetal, având ca rezultat sinteza şi utilizarea unei mari varietăţi de molecule din categoria glucidelor, aminoacizilor, acizilor graşi, nucleotidelor şi a polimerilor derivaţi de la acestea (polizaharide, proteine, lipide, ADN, ARN etc.). Totalitatea acestor procese este definită ca **metabolism primar** iar compuşii respectivi, care sunt esenţiali pentru supravieţuirea plantei, sunt descrişi ca metaboliţi primari. De altfel, metaboliţii primari sunt larg distribuiţi în natură, fiind prezenţi într-o formă sau alta în toate organismele, şi sunt necesari pentru creştere şi dezvoltare fiziologică generală. Ca urmare, pe parcursul a două secole, chimia modernă şi biologia s-au concentrat pe descrierea rolului metaboliţilor primari în procesele vitale fundamentale, precum creşterea şi diviziunea celulară, diferenţierea, respiraţia şi reproducerea.

Pe lângă metaboliţii *primari*, cu rol major în menţinerea viabilităţii plantei, în celulele vegetale funcţionează însă şi alte căi metabolice, prin care sunt sintetizaţi o serie de compuşi care includ terpene, steroizi, antociani, antrachinone, fenoli şi polifenoli, ce aparţin aşa-numitului **metabolism secundar**.

Introducerea conceptului de metabolit secundar îi este atribuită lui A. Kossel (1891) care pentru prima dată a încercat să definească aceşti compuşi prin antiteză cu ceea ce se cunoştea în domeniul metaboliţilor primari. Un pas important înainte s-a realizat 30 de ani mai târziu, datorită eforturilor lui F. Czapek (1921) care a dedicat un întreg volum descrierii a ceea ce numea *compuşi finali*, derivaţi din metabolismul azotului prin *modificări secundare*.

Metaboliții secundari sunt prezenți numai la anumite specii, adesea manifestând specificitate de organ sau de țesut, pot fi identificați numai într-un anumit stadiu al creșterii și dezvoltării în cadrul unei specii, sau pot fi activați numai pe parcursul perioadelor de stres, cauzate de pildă de atacul unor microorganisme sau de sărăcirea nutrienților, ceea ce a condus multă vreme la etichetarea lor drept *compuși de lux* sau *produse de excreție*, reprezentând „greșeli" ale metabolismului primar.

La mijlocul secolului al XX-lea, perfecționarea tehnicilor analitice, în special a cromatografiei, a permis descrierea și a numeroase molecule din categoria metaboliților secundari, ceea ce a constituit baza dezvoltării unei noi discipline – **fitochimia**. Biochimia și biologia moleculară au demonstrat apoi fără echivoc semnificația biologică pe care compușii metabolismului secundar o au în viața plantei (F. Bourgaud și colab., 2001).

Într-adevăr, sinteza lor pare fără semnificație directă pentru celula sintetizatoare, dar poate fi decisivă pentru dezvoltarea și funcționarea organismului ca întreg. Cu toate că sinteza lor nu constituie o parte indispensabilă a programului expresiei genice și dezvoltării, acești metaboliți nu reprezintă simpli produși catabolici, deoarece au o structură foarte diversificată și pot fi adesea reincluși în procesele metabolice. De fapt delimitarea între metabolismul primar și secundar este incertă, întrucât mulți dintre intermediarii metabolismului primar îndeplinesc roluri similare și în cadrul metabolismului secundar. Astfel, unii aminoacizi obscuri sunt în mod cert metaboliți secundari, în timp ce sterolii sunt compuși structurali esențiali ai multor organisme și în consecință trebuie considerați metaboliți primari. Suprapunerea rolurilor multor compuși asigură o interrelație strânsă între metabolismul primar și secundar, iar interpretarea delimitării dintre aceste procese trebuie făcută cu prudență [M. M. Yeoman și colab., 1996].

Compușii secundari vegetali sunt de regulă clasificați în funcție de căile biosintezei în 4 mari familii de molecule: fenoli, terpene, steroizi și alcaloizi. Dintre acestea, fenolii sunt foarte răspândiți în natură, iar întrucât sunt implicați în sinteza ligninei sunt cvasirăspândiți în lumea plantelor. Alți compuși, cum sunt alcaloizii, sunt specifici anumitor genuri și specii, constituind elemente de referință în chemotaxonomie și chemoecologie [C. Mota și colab., 2002].

Ca urmare, dată fiind conservarea lor pe parcursul evoluției regnului vegetal, este foarte plauzibilă interpretarea că metaboliții secundari oferă un avantaj selectiv speciilor. De exemplu la speciile unde polenizarea este realizată de către insecte, acestea sunt atrase de culoare, parfum sau de prezența nectarului, caracteristici datorate metaboliților secundari. Rolul pigmenților este evident și în răspândirea fructelor și a semințelor de către păsări și alte animale atrase de culorile vii ale structurilor vegetale. Stigmatele foarte colorate de la *Crocus sativus*, utilizate drept colorant alimentar, ca și culoarea roșu intens a ardeilor iuți (*Capsicum frutescens*) și iuțeala capsaicinei, au efect atractiv sau repelent asupra animalelor.

Întrucât plantele trăiesc în ecosisteme complexe, efectul factorilor abiotici şi interacţiunile cu alte organisme le-au obligat să-şi producă în timp o serie de metaboliţi utili implicaţi în interacţiuni vitale de tipul celor de apărare şi al simbiozelor. Unii compuşi din categoria metaboliţilor secundari sunt implicaţi în protecţia faţă de razele UV, de stres osmotic sau în interacţiunile alelopatice cu alte plante. Se cunoaşte de pildă că alelochimicalele sunt substanţe produse de plantele superioare care distrug selectiv sau inhibă creşterea microorganismelor şi chiar a altor plante. Aceşti compuşi aparţin în cea mai mare parte grupului metaboliţilor secundari, fiind din punct de vedere chimic terpenoizi, fenilpropanoizi, glucozizi cianogenici, alcaloizi etc.

Iată deci că metaboliţii secundari vegetali pot servi ca atractanţi pentru polenizatori, pot reprezenta adaptări chimice la stresul factorilor de mediu sau pot constitui mijloace chimice ofensive, defensive sau protectoare împotriva microorganismelor, insectelor, animalelor erbivore şi chiar împotriva altor plante superioare (cum este cazul compuşilor alelochimici, numiţi şi „erbicide naturale"), fiind evident rolul lor de compuşi activi în plan biologic, fiziologic şi ecologic (M. F. Balandrin şi colab., 1988). Recent s-a demonstrat că flavona luteolină exudată de rădăcinile lucernei serveşte ca semnal care activează genele rhizobiilor din rizosferă, jucând un rol important în colonizarea rădăcinilor şi stabilirea nodozităţilor. Un exemplu clasic de metabolit secundar, metiljasmonatul, familiar pentru parfumul de jasmin, este acum recunoscut ca parte a unui lanţ de traducere a semnalelor, care începe cu acidul gras a-linolenic, asociat cu membranele celulare, conducând la efecte pleiotropice diferite, de la activarea genelor de apărare până la senescenţă. O altă clasă de metaboliţi secundari, brassinosteroizii au roluri importante în reglarea dezvoltării plantelor sub influenţa luminii. Flavonolii sunt esenţiali pentru germinarea polenului şi pentru creşterea tubului polinic, plantele cu deficienţe în biosinteza de flavonoli fiind caracterizate prin sterilitate masculină [T. M. Kutchan, 2001].

De altfel, pe parcursul dezvoltării civilizaţiei, oamenii au înţeles că regnul vegetal dispune de o remarcabilă versatilitate la nivel biosintetic, exprimată prin producerea unei game largi de compuşi cu potenţiale utilizări practice, din categoria pigmenţilor, a condimentelor, aromelor şi parfumurilor. Condimentele cele mai cunoscute, ceaiurile şi alte băuturi precum cafeaua, kola, cacao etc. îşi datorează proprietăţile caracteristice şi unor metaboliţi secundari pe care-i conţin. De exemplu, aromele de cafea şi de ciocolată sunt rezultatul contribuţiei a peste 700 de compuşi, fapt ce face extrem de dificilă sinteza pe cale chimică a unor produse care să întrunească toate calităţile organoleptice ale celor naturale. Unele uleiuri volatile cu valoare comercială ridicată cum sunt uleiurile de trandafir sau de jasmin, de asemenea constau din amestecuri complexe care sunt foarte greu de imitat sau de substituit cu compuşi purificaţi.

Sunt numeroase alte exemple de compuşi bioactivi din categoria metaboliţilor secundari, dintre care trebuie să amintim în primul rând nicotina,

piretrinele şi rotenona care sunt utilizate ca pesticide şi anumiţi steroizi şi alcaloizi utilizaţi în industria medicamentelor.

Extractele vegetale au fost utilizate ca insecticide încă din timpul Romei antice, iar în prezent se cunosc peste 2000 de specii de plante cu proprietăţi insecticide. Piretrinele constituie cel mai important compus natural vegetal folosit pentru controlul insectelor la scară comercială. Piretrinele, alături de cinerine şi jasmoline, constituie un grup de esteri strâns înrudiţi extraşi din florile de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, şi au început să fie comercializate ca insecticide încă din 1828. În prezent se procesează anual peste 25 000 tone de flori produse în principal în Kenia, Tanzania şi Ecuador pentru extragerea compuşilor cu efect insecticid. Pe de altă parte, rotenonele şi rotenoizii, extrase din rădăcinile unor leguminoase (*Derris, Lonchocarpus şi Tephrosia sp.*), au încă o largă utilizare nu numai ca insecticide, ci şi ca piscicide. În Brazilia se aplică mii de tone de pudră obţinută din rădăcinile acestor plante pentru a elimina peştii pirania din râurile rezervaţiilor.

Unele dintre cele mai promiţătoare insecticide de origine vegetală sunt considerate în prezent azadirachtinul şi alţi limonoizi prezenţi la specii de plante din familiile *Meliaceae* şi *Rutaceae*, cu un pronunţat efect repelent asupra insectelor, dar inofensivi pentru animalele cu sânge cald.

Metaboliţii secundari au stereostructuri deosebit de complexe şi, de aceea, în multe cazuri sinteza lor la scară comercială este fie foarte costisitoare, fie foarte greu sau chiar imposibil de realizat. Este de subliniat faptul că în ciuda progreselor importante realizate în domeniul sintezelor din chimia organică, plantele încă reprezintă sursa majoră pentru 25% din totalul medicamentelor prescrise în S.U.A. [M. M. Yeoman şi colab., 1996]. De regulă, metaboliţii secundari nu sunt produşi ai unor gene unice, ci ai unor secvenţe multigenice şi de aceea construirea unor microorganisme modificate genetic care să realizeze astfel de sinteze nu pare posibilă în viitorul apropiat. Există însă o serie de elemente datorită cărora resursele vegetale nu constituie totdeauna o bază sigură de obţinere a metaboliţilor secundari bioactivi:

– biosinteza acestora este restrânsă numai la anumite specii sau genuri vegetale, având totodată specificitate de organ şi chiar de ţesut;

– multe specii de plante recunoscute drept surse consacrate de metaboliţi secundari de interes cresc numai în biotopuri specifice, adesea în locuri greu accesibile şi nu se adaptează altor ecosisteme;

– calitatea şi cantitatea de compuşi secundari este variabilă, în funcţie de factori climatici şi de alţi factori de stres;

– datorită colectării necontrolate a unor specii din flora spontană, multe resurse genetice vegetale nu mai sunt disponibile.

Balandrin şi Klocke (1988) au efectuat o evaluare amănunţită a efectelor terapeutice şi a valorii comerciale a celor mai importante substanţe bioactive

extrase din plante, care includ sapogenine steroidale (digoxin şi digitoxin), alcaloizi cu efect anticancerigen (vincristin şi vinblastin), alcaloizi beladonici (atropină, hiosciamină şi scopolamină) şi numeroşi alţi compuşi utilizaţi în industria medicamentelor, ca de exemplu: cocaină, colchicină, alcaloizi de tip opium, fitostigmină, pilocarpină, chinină, chinidină, reserpină şi d-tubocurarină (tabelul 23.1).

Chiar şi aspirina, care este un acetil salicilat, derivă de la salicilat, iar molecula naturală poate fi izolată în cantităţi mari de la multe specii de plante (*Spiraea ulmaria, Betula lenta etc.*). Medicamentul este însă sintetizat ca un derivat acetil pentru a diminua efectele stomacale nedorite.

Tabelul 23.1

Exemple de compuşi de interes farmaceutic obţinuţi la scară comercială din surse vegetale (după Balandrin şi Klocke, 1988)

Clasa de compuşi	Sursele botanice	Utilizarea terapeutică
A. Steroizi		
Hormoni (derivaţi ai diosgeninei, hecogeninei şi stigmasterolului)	*Dioscorea sp.*, *Glicine sp.*	Contraceptivi orali şi alţi hormoni steroizi
Glicozizi digitalici (digoxin, digitoxin)	*Digitalis purpurea*, D. *lanata*	Cardiotonici
B. Alcaloizi		
Alcaloizi beladonici (atropină, l-hiosciamină, scopolamină)	*Atropa belladonna*, *Datura stramonium*	Anticolinergici
Alcaloizi tip opium (codeină, morfină)	*Papaver somniferum*	Analgezici
Reserpină	*Rauwolfia serpentina*	Antihipertensivi, psihotropici
Vincristină, vinblastină	*Catharanthus roseus*	Anticancerigeni
Physostigmină	*Physostigma venenosum*	Cholinergic
Pilocarpină	*Pilocarpus sp.*	Cholinergic
Chinină, chinidină	*Cinchona sp.*	Antimalaric, antiaritmie cardiacă
Colchicină	*Colchicum autumnale*	Gută
Cocaină	*Erythroxylon coca*	Anestezic local
d-Tubocurarină	*Strychnos sp.*, *Chondodendron tomentosum*	Relaxant muscular

Valoarea metaboliților secundari utilizați în industria farmaceutică poate ajunge la mii de dolari per kilogram. De exemplu, alcaloizii de tip opium purificați (codeina și morfina) au valori de 650–1250 USD/kg, iar uleiurile volatile esențiale, ca cel de trandafir, sunt evaluate la peste 2000–3000 USD/kg. Alcaloizii extrași din *Catharanthus roseus* ating valori de până la 20 000 USD/g. Aceste prețuri ridicate se datorează atât metodelor costisitoare de izolare, cât și cantităților extrem de reduse ce pot fi obținute din sursele vegetale. Astfel, cantitatea de vincristin izolat din plante de *Catharanthus roseus* este de aproximativ 0,0003–0,0005 %, fiind necesare 500 kg de frunze pentru a produce numai 1 g de vincristin purificat, proces care durează mai multe săptămâni. Cu toate acestea, plantele rămân singurele surse de extracție, întrucât mulți dintre metaboliții secundari de interes farmaceutic nu pot fi sintetizați pe cale chimică, fiind stereostructuri complexe cu mulți centri chirali care pot fi esențiali pentru activitatea biologică.

Metaboliții vegetali primari și secundari de interes economic au câteva caracteristici comune: majoritatea sunt compuși chimici non-proteici, pot fi extrași din materialul vegetal prin distilare cu aburi, cu solvenți organici sau apoși, iar cu excepția biopolimerilor cauciucului natural, a taninurilor condensate și a unor polizaharide ca gumele, pectinele și amidonul, sunt compuși cu greutate moleculară mică (sub 2000 Da).

Anumiți metaboliți secundari biologic activi, care de regulă sunt toxine de origine vegetală, au căpătat aplicații în medicină fie prin prepararea unor medicamente din extracte vegetale, fie prin aceea că au servit ca „modele" pentru sinteza sau semisinteza de medicamente. Numeroși compuși naturali de interes farmaceutic, obținuți în trecut din surse vegetale sunt în prezent produși prin sinteză, exemple în acest sens fiind cafeina, theofilina, theobromina, efedrina, pseudoefedrina, emetina, L-dopa, acidul salicilic și tetrahidrocanabinolul. În ultimii ani a început însă a fi reconsiderată importanța pe care compușii vegetali naturali o prezintă ca modele chimice pentru crearea și sinteza totală a unor noi medicamente. În acest sens este de menționat faptul că alcaloizii beladonici, physostigmina, chinina, cocaina, codeina, morfina și acidul salicilic au servit ca modele pentru sinteza unor medicamente anticolinergice, anticolinesterazice, antimalarice și a multor anestezice locale.

Spre deosebire de medicamentele sintetice bazate, în general, pe substanțe unice, multe fitomedicamente își datorează efectele benefice acțiunii aditive sau sinergice a mai multor compuși chimici care acționează la situsuri multiple asociate cu diferite procese fiziologice, fiind eliminate astfel efectele secundare asociate cu predominanța unui singur compus xenobiotic în organism. Cu toate acestea se estimează că numai 5–15 % din cele 250 000 dintre speciile de plante superioare cunoscute până în prezent au fost evaluate privind activitatea biologică și identificarea de compuși bioactivi potențial utili. Ca urmare lista speciilor de plante cărora li se acordă un interes considerabil în ultimii ani se îmbogățește încontinuu, deoarece a devenit evident faptul că produsele naturale vegetale vor continua să reprezinte surse de neînlocuit și modele pentru condimente, arome, parfumuri,

uleiuri vegetale, săpunuri, cauciuc natural, gume, răşini, medicamente, insecticide şi alte materii prime semnificative pentru industrie, medicină şi agricultură. Totodată, s-au intensificat studiile de fitochimie pentru caracterizarea speciilor cu privire la compuşii bioactivi pe care-i sintetizează şi studiile de horticultură, pentru optimizarea condiţiilor de cultură a unor specii din flora spontană.

D. P. Briskin (2000) realizează o sinteză a studiilor de biochimie şi farmacologie la 4 dintre speciile de plante medicinale care au captat recent atenţia specialiştilor vestici, evidenţiind importanţa cunoaşterii efectului factorilor de mediu asupra metabolismului secundar şi implicit asupra cantităţii şi calităţii compuşilor fitomedicinali, aceşti parametri putând varia nu numai în funcţie de potenţialul genetic, ci şi de modularea generată de factorii de mediu. Astfel, atât în cazul ginsengului (*Panax ginseng*), cât şi în cazul altor specii (*Hypericum perforatum*, *Ginkgo biloba*, *Piper methysticum* şi *Echinacea sp.*), suplimentul mineral din sol, lumina, faza fenologică, regimul de irigare sunt factori care influenţează calitatea şi conţinutul în metaboliţi secundari bioactivi.

23.2.1. Paradigma metabolismului secundar în celulele vegetale; abordări biotehnologice

Rapiditatea procesului de extincţie a speciilor în epoca modernă ca urmare a perturbării echilibrului mediului natural şi a exploatării nelimitate a unor specii a condus la reconsiderarea importanţei vitale a resurselor genetice vegetale şi totodată la identificarea unor metode alternative, neconvenţionale, pentru obţinerea de metaboliţi secundari de interes.

Întrucât multe dintre speciile vegetale producătoare de compuşi secundari bioactivi cresc numai în anumite zone climatice iar sinteza acestor metaboliţi cu structură complexă pe cale artificială este neeconomică, se înregistrează fluctuaţii considerabile ale materiei prime şi implicit ale preţului de cost. În plus, o serie de reglementări elaborate în multe ţări limitează utilizarea produselor sintetice în special ca aditivi alimentari sau medicamente, fapt ce a stimulat cercetările privind obţinerea de metaboliţi secundari în culturi de celule, de ţesuturi şi de organe vegetale.

Încă din 1952 J. B. Routien şi L. G. Nickel au obţinut un brevet cu titlul *Cultivarea celulelor vegetale*, demonstrând cu acest prilej că celulele vegetale pot să crească în medii lichide şi că aceste celule pot fi utilizate pentru obţinerea de compuşi chimici utili. Dar abia 30 de ani mai târziu, în 1982, Z. Fujita şi colab. au raportat producerea primului produs natural la scară comercială, shikoninul, din culturi celulare de *Lithospermum erythrorhizon*.

În prezent, este general acceptat faptul că în cadrul noilor biotehnologii tehnicile moderne de culturi de ţesuturi şi de celule vegetale oferă potenţiale relevante de aplicabilitate în multe domenii biotehnologice competitive, vizând obţinerea unor medicamente, produse alimentare, pigmenţi naturali, alimentari sau

industriali, arome alimentare sau produse cosmetice. Aceste studii se desfășoară atât la nivel fundamental cât și sub forma cercetărilor aplicative care utilizează culturi de celule vegetale în bioreactoare, pentru producerea metaboliților secundari la scară comercială.

Intensa concentrare a cercetărilor efectuate în diferite laboratoare din lume în scopul utilizării culturilor de țesuturi și celule vegetale ca surse potențiale de metaboliți utili poate fi explicată prin avantajele importante oferite de acestea, ca de exemplu:

– metaboliții utili pot fi obținuți în condiții controlate de mediu, în flux continuu, pe tot parcursul anului, indiferent de factorii climatici sau de însușirile solului dintr-o anumită zonă geografică;

– culturile celulare sunt necontaminate de microorganisme sau de insecte;

– celulele oricărei plante, din zone tropicale sau cu climă rece, pot fi cultivate *in vitro* și multiplicate la nivel de bioreactor în scopul producerii metaboliților specifici la scară comercială;

– controlul creșterii celulare și reglarea proceselor metabolice contribuie la reducerea costului forței de muncă și la îmbunătățirea productivității;

– compușii produși în culturi celulare pot fi mai ușor purificați și în consecință costurile de producție sunt mai mici;

– ciclurile biosintetice ale celulelor din culturi sunt mult mai rapide decât cele ale plantei în condiții naturale;

– prin selecție clonală și prin mutageneză pot fi izolate linii celulare care sintetizează metaboliți secundari în cantități chiar mai mari decât cele prezente în organele specializate ale plantei intacte;

– culturile celulare pot realiza biotransformarea unor substraturi pentru obținerea unor noi compuși neidentificați în natură sau pentru producerea unor enzime utilizabile în sinteza chimică a compușilor naturali;

– biotransformarea conduce la convertirea unor precursori ieftini în compuși finali care pot fi valorificați la prețuri ridicate [A.W. Alfermann și M. Petersen, 1995].

23.3. DIFERENȚIERE CELULARĂ ȘI TOTIPOTENȚĂ ÎN CULTURI DE CELULE VEGETALE

Organismul vegetal este constituit din sute de milioane de celule care, fiind rezultatul diviziunilor succesive ale unei celule inițiale – zigotul – moștenesc aceeași informație genetică. În ciuda faptului că celulele care alcătuiesc un organism multicelular posedă genomuri identice, ele manifestă o pronunțată

diversitate, exprimată atât la nivel morfologic cât şi funcţional, în corelaţie cu funcţiile specializate pe care le îndeplinesc. Diferenţierea unor tipuri celulare specifice nu poate fi explicată decât admiţând că unele gene funcţionează permanent, iar altele numai temporar, în momente specifice din ontogeneză. Intr-o celulă specializată sunt active numai genele care controlează funcţia respectivă şi activităţile generale de întreţinere a viabilităţii celulare, restul genelor având activitatea blocată. Procesul de activare sau de represie a genelor se realizează parţial prin interacţiunea nucleu – citoplasmă şi parţial prin interacţiunea dintre celule, iar întregul proces este influenţat de semnalele care vin permanent din mediul ambiant.

Exprimarea selectivă a unor părţi distincte ale informaţiei genetice celulare este deci şi rezultatul răspunsului la semnale din mediul extracelular (nutrienţi, hormoni, factori fizici), semnale recunoscute şi prelucrate de către celulele respective. Fluxul de informaţii din mediul extracelular este filtrat prin sistemele de prelucrare a semnalelor din membranele celulare şi din citoplasmă, spre situsurile unde are loc expresia genică. În acest fel are loc integrarea efectivă a activităţilor celulare în entitatea structurală şi funcţională a organismului, este posibilă supravieţuirea şi reproducerea acestuia.

În urma procesului de diferenţiere celulară apar diferenţe stabile între celulele unui individ, care, în condiţii normale, nu mai permit reîntoarcerea la starea iniţială, din stadiul embrionar. Dar de vreme ce nucleii tuturor celulelor diferenţiate continuă să poarte toată informaţia genetică prezentă în nucleul zigotic, acestea se pot reîntoarce în condiţii speciale la starea de celule embrionare, când îşi pot exprima întregul potenţial genetic intrinsec, deci se pot comporta ca un zigot. Această însuşire a celulei vegetale portă numele de **totipotenţă**, iar capacitatea celulelor de a-şi exprima totipotenţa, ca răspuns la stimuli specifici, poartă numele de **competenţă.**

Însuşirea de totipotenţă ce caracterizează toate celulele vegetale nucleate, vii, indiferent de funcţiile specializate pe care acestea le îndeplinesc în organismul multicelular, a fost pe deplin demonstrată odată cu dezvoltarea tehnicilor de culturi *in vitro* la plante. Prin detaşarea unui fragment de ţesut dintr-un organism vegetal, reţeaua de semnale intra şi extracelulare este mult simplificată, iar dacă fragmentul de ţesut este plasat în condiţii corespunzătoare *in vitro*, se poate realiza atât exprimarea **totipotenţei morfogenetice**, prin reconstituirea unui organism întreg de la celule somatice, cât şi a **totipotenţei biochimice**, prin declanşarea la nivelul celulelor din cultură a întregului potenţial al metabolismului secundar caracteristic speciei.

Cunoaşterea factorilor care induc modificări previzibile ale stării de diferenţiere şi de competenţă celulară este foarte importantă pentru a putea controla şi dirija exprimarea totipotenţei celulelor vegetale, ca o condiţie de bază a utilizării culturilor de celule şi de ţesuturi atât pentru regenerarea de plante, cât şi pentru producerea de metaboliţi secundari de interes industrial.

23.4. CALUSURI ŞI CULTURI CELULARE ÎN SUSPENSIE

S-a demonstrat în cazul multor specii că în condițiile asigurării nutrienților esențiali şi a reglatorilor de creştere specifici în mediul de cultură, celulele explantelor vegetale pot fi stimulate să prolifereze şi să formeze o masă de țesut cu creştere neorganizată, cu aspect tumoral, numită **calus.** Cercetările care au demonstrat posibilitatea controlului hormonal al citodiferențierii, morfogenezei şi implicit al totipotenței celulelor vegetale au generat un interes deosebit pentru utilizarea calusului în biologia experimentală. Calusurile au reprezentat mulți ani principalul tip de cultură *in vitro* şi deşi inițial au fost destinate mai ales studiilor de morfogeneză şi fiziologie, culturile de calus au fost ulterior tot mai mult folosite ca etape intermediare în multiplicarea genotipurilor valoroase sau în scopul producerii unor substanțe de interes industrial.

Calusurile tipice sunt alcătuite din celule de tip parenchimatic, alături de care coexistă şi alte tipuri celulare, diferite ca morfologie şi ca dimensiuni, cum sunt celule xilematice sau floematice, secretoare, celule de tip cambial, celule cu pereți lignificați sau celule în vacuolele cărora se acumulează taninuri sau alți produşi ai metabolismului celular.

Din punct de vedere morfologic calusul poate fi descris ca friabil sau compact. Aceste caracteristici sunt determinate de compoziția peretelui celular al celulelor componente: celulele calusului compact posedă o proporție mai mare de pectine şi de hemiceluloze în pereții celulari comparativ cu celulele calusului friabil, şi ca urmare calusul friabil se dispersează cu uşurință în mediul lichid, de regulă în condiții de agitare (90–150 r/m), formând **culturi celulare în suspensie.**

Mediile lichide oferă avantajul facilitării schimburilor gazoase, înlătură polarizarea indusă de gravitație, elimină gradientul nutrienților din mediu, variațiile în incidența luminii, iar în plus toate celulele vin în contact cu nutrienții şi cu stimulatorii introduşi în mediul de cultură.

Inocularea unor fragmente de calus friabil în mediu lichid, în condiții de agitare, nu conduce de regulă la obținerea unor suspensii de celule individuale dispersate, deoarece pereții celulelor plantelor au tendința naturală de a adera şi ca urmare suspensiile celulare conțin atât celule libere cât şi agregate celulare de diferite dimensiuni. Gradul de dispersare a celulelor în suspensii este corelat cu concentrația reglatorilor creşterii din mediul de cultură, fiind de exemplu cunoscut faptul că auxinele stimulează activitatea unor enzime care produc disocierea lamelei mijlocii din pereții celulari.

Culturile de celule vegetale au natură dinamică, astfel încât prin variația controlată a condițiilor nutriționale şi hormonale se poate realiza activarea unor procese metabolice şi fiziologice şi, implicit, modificarea stării de diferențiere, a capacității morfigenetice sau a sintezei de metaboliți secundari.

Creşterea calusului şi a culturilor celulare în suspensie poate fi cuantificată prin evaluarea greutăţii proaspete, a greutăţii uscate, a numărului de celule şi a dimensiunii celulelor într-un anumit interval de timp.

În faza iniţială a stabilirii culturilor celulare, numită şi faza de *lag* se intensifică procesele metabolice, creşte rata sintezelor proteice, a acizilor nucleici, activitatea unor enzime specifice, fenomene care pregătesc celulele pentru mitozele active, caracteristice fazei următoare, numită faza creşterii exponenţiale. În această etapă cresc în mod corespunzător greutatea umedă şi cea uscată, ca şi numărul celulelor, în timp ce dimensiunea celulelor atinge valori minime.

Diviziunile celulare intense continuă până când anumiţi nutrienţi din mediul de cultură ating concentraţii suboptimale, moment în care cultura celulară intră în faza staţionară, caracterizată printr-un declin al ratei diviziunilor celulare, al respiraţiei, al sintezei de proteine şi de acizi nucleici, dar creşte în schimb proporţia celulelor de dimensiuni mari, vacuolate, care se divid rar.

Culturile celulare în suspensie sunt de două tipuri:

– *culturi batch*, iniţiate prin inocularea celulelor într-un volum fix de mediu de cultură; pe măsură ce nutrienţii din mediu sunt consumaţi, o serie de produşi ai metabolismului se acumulează, aceste procese conducând la încetarea creşterii;

– *culturi continue*, la care mediul de cultură este reîmprospătat la anumite intervale [A. Roşu, 1999].

Pentru a obţine clone de la celule individuale sau linii celulare, suspensiile celulare sunt filtrate prin filtre cu pori de dimensiuni astfel alese încât să reţină agregatele mari şi să permită trecerea doar a celulelor individuale şi a unor agregate celulare mici. Separarea celulelor poate fi realizată şi cu anumite preparate enzimatice ca pectinaza sau poligalacturonaza, care digeră pectinele din lamela mijlocie a pereţilor celulari.

Cu toate că există adesea diferenţe relevante în ce priveşte sinteza şi acumularea metaboliţilor secundari în diferite ţesuturi sau în faze diferite ale dezvoltării plantei, genomul fiecărei celule conţine informaţia necesară pentru a declanşa întregul potenţial al metabolismului secundar caracteristic speciei.

Tehnicile *in vitro* realizează stimularea exprimării complete a unor secvenţe metabolice care au ca rezultat sinteza unui metabolit dorit, fapt ce oferă importante avantaje economice prin posibilitatea realizării sintezei la scară industrială, în bioreactoare, ca şi prin dirijarea selectivă a unor anumite secvenţe biosintetice, în funcţie de scopul urmărit.

Multă vreme s-a considerat că spre deosebire de celulele diferenţiate din ţesuturile şi organele plantei, specializate pentru sinteza sau pentru acumularea de metaboliţi secundari, celulele de calus sau celulele din suspensii celulare nu sunt capabile să producă metaboliţii secundari specifici. Plantele superioare sunt structuri multicelulare înalt diferenţiate, în cadrul cărora există o considerabilă diviziune a muncii între celule şi ţesuturi, astfel că se poate anticipa că în condiţiile artificiale de creştere ca celule izolate sau ca agregate celulare, acestea să nu fie

capabile să producă metaboliți secundari care în condiții normale sunt asociați cu structurile diferențiate ale plantei. Florile, fructele, frunzele mature, rădăcinile mature, scoarța, toate acestea sunt situsuri importante de acumulare a metaboliților secundari, celulele acestor structuri fiind mature și caracterizate printr-un înalt grad de diferențiere. S-a demonstrat în numeroase cazuri că există o corelație directă între diferențiere sau organizare și producerea de metaboliți secundari și o corelație inversă între creșterea celulară, respectiv acumularea de biomasă *in vitro* și biosinteza de metaboliți secundari [Yeoman și colab., 1996]. Cu toate acestea, Zenk și colab. (1991) au demonstrat că în culturile celulare dediferențiate de la *Morinda citrifolia* se acumulează 2,5 g de antrachinone per litru de mediu, fapt ce a stimulat mult cercetările vizând producerea de metaboliți secundari, mai ales pigmenți și de uz farmaceutic, în culturi celulare. Există și exemple ce ilustrează existența unei corelații strânse între cantitatea de biomasă celulară și cea de compuși secundari: producerea de betalainâ în culturi celulare de *Phytolacca americana* și de *Beta vulgaris* sau producerea de podofilotoxină în calusuri de *Podophyllum.*

Comparativ cu kinetica creșterii celulare, care poate fi reprezentată printr-o curbă exponențială, majoritatea metaboliților secundari sunt produși în timpul fazei staționare. Acest fenomen se poate explica prin faptul că în fazele anterioare carbonul este distribuit în principal pentru metabolismul primar (respirație și structurare celulară), în corelație cu creșterea și diviziunile celulare active. Atunci când creșterea încetează, carbonul nu mai este necesar în cantități mari pentru metabolismul primar, și atunci se intensifică sinteza metaboliților secundari. Într-adevăr, s-a observat frecvent că multe activități enzimatice noi, absente în faza de *lag* sau în cea logaritmică, apar numai în faza staționară. Aceasta i-a determinat pe mulți autori să considere instalarea unei diferențieri celulare biochimice odată cu încetarea creșterii [F. Bourgaud și colab., 2001].

Încă din 1977 M. H. Zenk și colab. au recomandat o strategie menită să contribuie la obținerea unor cantități semnificative de compuși naturali în culturi de celule vegetale, prin parcurgerea următoarelor etape:

– testarea și selecția unor plante inițiale caracterizate prin capacitate crescută de biosinteză și acumulare a unor compuși naturali de interes;

– stabilirea culturilor de calus de la plantele donor selectate; această etapă vizează optimizarea mediilor de cultură atât în ce privește compoziția minerală și constituenții organici cât și balanța hormonală, factori importanți care guvernează mecanismele de dediferențiere/rediferențiere *in vitro*;

– efectuarea de analize chimice pentru stabilirea concentrației produsului natural în culturile de calus;

– stabilirea de culturi celulare în suspensie;

– efectuarea de analize chimice la nivelul liniilor celulare în suspensie;

– selecția liniilor celulare înalt producătoare prin clonări unicelulare, ca rezultat al variabilității somaclonale sau al unor tratamente mutagene;

– creșterea liniilor celulare înalt producătoare, stabile, în bioreactoare;

– ameliorarea producerii de metaboliţi secundari prin optimizarea parametrilor de cultură fizici şi chimici.

Cu toate că această strategie a fost adoptată şi utilizată de numeroşi specialişti, timp de mai mulţi ani obţinerea la scară comercială a unor metaboliţi secundari importanţi în culturi celulare s-a limitat la câteva produse: shikoninul, un pigment roşu cu proprietăţi antiseptice – în culturi celulare de *Lythospermum erythrorhizon*; berberina, folosită în tratamentul unor afecţiuni stomacale – în culturi celulare de *Coptis japonica*; ginsenosidele – în culturi celulare de *Panax ginseng*; şi purpurină – în culturi celulare de la *Rubia akane*.

Utilizarea eficientă a culturilor celulare în scopul producerii de compuşi secundari, implică satisfacerea următoarelor condiţii:

– rata creşterii celulare şi a biosintezei trebuie să fie suficient de ridicate pentru a se obţine o cantitate semnificativă de produs final intr-o perioadă de timp optimă;

– culturile trebuie să fie stabile genetic pentru a produce cantităţi ridicate de metaboliţi secundari în mod constant;

– metaboliţii să se acumuleze în celule fără a fi catabolizaţi rapid sau, preferabil, să fie eliberaţi în mediul lichid;

– preţul producţiei, incluzând costul mediului de cultură, precursorii şi extracţia chimică să fie suficient de scăzut pentru ca procesul să fie profitabil.

Productivitatea culturilor constituie parametrul cel mai important care se evaluează pentru stabilirea rentabilităţii acestor tehnologii, şi se exprimă ca grame produs/l de cultură/zi, deci reprezintă: suma ratei creşterii + cantitatea de produs secundar acumulată + cantitatea de biomasă.

O dificultate majoră semnalată de diverşi autori constă în instabilitatea liniilor celulare în ce priveşte acumularea de metaboliţi secundari şi în faptul că parametrii optimizaţi individual în faza de laborator nu acţionează sinergic şi nu conduc la rezultate reproductibile în bioreactoare cu volum mare [A. W. Alfermann şi M. Petersen, 1995].

23.5. VARIABILITATEA SOMACLONALĂ ÎN CULTURILE DE CALUS ŞI DE CELULE ÎN SUSPENSIE

Într-o populaţie de celule cultivate *in vitro* există diferenţe privind structura, dimensiunea, cariotipul şi comportamentul metabolic. Fără îndoială că unele dintre aceste diferenţe îşi au originea în natura explantului de la care a fost iniţiată cultura, dar majoritatea sunt determinate de înseşi condiţiile de cultură *in vitro*.

Condiția multicelulară a explantelor utilizate pentru inițierea culturilor *in vitro* presupune existența unor tipuri celulare diferite, ca de exemplu: parenchim floematic sau xilematic, parenchim asimilator, parenchim de rezervă, țesut cortical, celule epidermale, celule ale meristemelor primare sau secundare etc. Aceste celule au o morfologie diferită, corelată cu specializarea lor funcțională, și în același timp pot prezenta grade diferite de ploidie, mai ales la speciile polisomatice. De altfel condiția polisomatică este prezentă la peste 90% dintre speciile de plante, întrucât mutațiile pot apărea spontan în orice celulă și în orice moment al dezvoltării organismului, sub acțiunea unor factori ca: temperaturile extreme, radiațiile cosmice, elementele radioactive naturale și alți factori ai mediului natural, ca și sub influența unor factori metabolici.

Încă din 1901 H. de Vries descrie în lucrarea sa clasică privind teoria mutațiilor o creștere pronunțată a ratei mutațiilor spontane la plantele de *Oenothera lamarckiana* obținute din semințe păstrate pe o perioadă lungă, evidențiind rolul metabolismului în acumularea progresivă a mutațiilor în semințe.

În prezent este bine cunoscut faptul că mutațiile din semințele mature sunt rezultatul acțiunii chimice a metaboliților și a produșilor catabolici care se acumulează pe parcursul păstrării și s-a demonstrat experimental că extractele obținute din astfel de semințe au efect mutagen asupra aceleiași specii sau asupra unor specii diferite.

O serie de substanțe chimice mutagene cu o largă incidență în produsele vegetale reprezintă dovezi indirecte ale corelației dintre mutațiile spontane și metabolism (amine, aminoacizi, amide, acizi fără azot, aldehide, alcaloizi, fenoli și chinone, tropolene, cumarine și produși ai degradării acizilor nucleici).

În condiții fiziologice normale plantele sunt protejate de acțiunea mutagenilor proprii fie prin separarea fizică a enzimei și a substratului în compartimente celulare diferite, fie prin blocarea anumitor procese biochimice. Dar în anumite condiții metabolice nu mai acționează mecanismele protectoare la nivel celular și ca urmare planta poate fi expusă acțiunii propriilor mutageni (automutageneză). Genomul celulelor care alcătuiesc explantul inițial influențează substanțial heterogenitatea cariologică a culturilor *in vitro*, deoarece modificările genetice preexistente *in vivo*, instalate pe parcursul procesului de diferențiere celulară, se propagă și se amplifică în noile condiții de cultură, generând populații celulare cu o pronunțată variabilitate genotipică și fenotipică.

Stimularea creșterii și a diviziunilor celulare prin plasarea explantului într-un mediu fizic și chimic nou, relativ ostil, are ca rezultat înlăturarea unor comunicații intercelulare care funcționează în planta intactă. Perturbarea organizării structurale care asigură dezvoltarea ordonată și funcționarea sistemelor tisulare în noile condiții de mediu determină perturbări ale proceselor normale de control genetic care funcționează în și între celulele organismului intact, cu efecte

variind de la modificări discrete (criptice) la nivel molecular până la anomalii cromozomale grosiere, exprimate prin modificări fenotipice dintre cele mai diverse. Prin cultivarea *in vitro* celulele trec de la mediul stabilizat din cadrul organismului intact la noile condiţii din vasele de cultură, stres ce declanşează modificări genomice care pot fi destul de pronunţate în cazul unor populaţii celulare care proliferează activ.

În 1981 P. J. Larkin şi W. R. Scowcroft introduc termenul de **variabilitate somaclonală,** care a căpătat o largă utilizare în literatura de specialitate, desemnând o gamă largă de modificări genetice care pot apărea în condiţiile *in vitro*, ca urmare a unor modificări cariotipice grosiere sau discrete.

Incidenţa variabilităţii somaclonale a fost semnalată în culturile *in vitro* de la multe specii, fenomenul accentuându-se o dată cu prelungirea duratei de cultură, mai ales în calusuri şi la culturile de celule în suspensie. Pe lângă compoziţia mediului de cultură (în primul rând, suplimentul hormonal introdus în mediu), o serie de alţi factori, între care genotipul, vârsta culturii, frecvenţa subcultivărilor, au un rol important în generarea diversităţii genetice *in vitro*.

Variabilitatea în culturile de celule şi de ţesuturi se manifestă sub raport fiziologic şi morfologic printr-o serie de elemente, incluzând: habituarea, modificări ale activităţilor biosintetice, modificări ale tipului de creştere şi ale constituenţilor celulari.

Capacitatea celulelor din culturi de a acumula pigmenţi şi metaboliţi secundari ca alcaloizi, steroizi, terpene etc., reprezintă aspecte ale diferenţierii fiziologice care indică faptul că celulele au devenit specializate. Totodată, în cadrul aceleiaşi culturi de calus se pot individualiza linii celulare care pot varia ca aspect, textură, friabilitate, pigmentaţie, potenţial de creştere şi morfogenetic, cerinţe metabolice, rezistenţă la factori fizici şi chimici, ploidie şi totipotenţă.

Unele culturi celulare menţinute *in vitro* pe perioade îndelungate prin subcultivări repetate pot deveni la un moment dat autotrofe în ceea ce priveşte auxinele sau citochininele administrate exogen, fenomen denumit **habituare** sau **anergie**. Celulele habituate capătă proprietăţi tumorale, deoarece îşi pierd capacitatea de a percepe semnalele care coordonează dezvoltarea lor normală şi devin autonome, capabile de a se multiplica în absenţa factorilor de creştere exogeni. Habituarea este însă un fenomen reversibil, deci epigenetic şi nu mutagen, ceea ce demonstrează că pot avea loc şi modificări profunde ale fenotipului celular, care nu corespund unor modificări ale integrităţii genomului.

Variaţiile somaclonale, cu toate că sunt considerate detrimentale pentru stabilitatea şi omogenitatea culturilor, pot fi exploatate ca surse de diversitate genetică, prin generarea unei game largi de tipuri celulare, cu capacităţi biosintetice diferite [M. M. Yeoman şi colab., 1996].

Şi mutageneza indusă se aplică sistemelor de culturi *in vitro* cu diferite grade de complexitate, inclusiv culturilor de calus şi de celule în suspensie. Marele

avantaj al sistemelor *in vitro* constă în posibilitatea tratării unui număr foarte mare de celule cu agenți mutageni și a efectuării selecției în condiții controlate.

Mutageneza indusă se bazează pe utilizarea unor agenți mutageni fizici sau chimici.

Din categoria mutagenilor fizici sunt folosite cu predilecție radiațiile ionizante, în special razele gamma din surse de izotopi, care au capacitatea de a penetra nucleul, de a inactiva anumite părți ale materialului genetic sau de a induce aberații genetice.

Efectul radiațiilor asupra celulelor cultivate *in vitro* nu este numai direct, ci și indirect, prin modificări induse în mediul de cultură, ca urmare a radiolizei unor componente ale acestuia. Astfel, în funcție de doză, iradierea afectează capacitatea agarului de a se gelifica, induce modificări ale *p*H-ului mediului de cultură sau produce hidroliza sucrozei din mediu, modificări care influențează la rândul lor creșterea și diferențierea *in vitro*.

Aprecierea efectului pe care o anumită doză de radiații îl are asupra celulelor se poate realiza la nivel molecular (degradarea enzimelor și a acizilor nucleici), la nivel cromozomal (aberații), la nivel fiziologic (efectul asupra respirației, a biosintezelor de hormoni, de metaboliți primari și secundari), la nivel celular (creștere celulară, diviziune, diferențiere).

Agenții mutageni chimici acționează direct asupra moleculelor de ADN, determinând atât modificări ale secvențelor de nucleotide, cât și ale structurii nucleotidelor. Frecvent utilizați sunt mutagenii care aparțin grupului agenților alchilanți, cum sunt etil-metan-sulfonatul (EMS) și metil-metan-sulfonatul (MMS). Acțiunea lor mutagenă constă în adăugarea de grupări metil sau etil la guanină, care astfel se comportă ca un analog al adeninei și produce erori de împerechere.

Alți mutageni chimici sunt analogi ai bazelor azotate, ca de exemplu 5-bromodeoxiuridina (BudR) și 5-bromouracilul (BU), sau compuși nitroși, cum sunt N-metil-N'–nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) și N-etil-N-nitrosoureea (ENU). Un alt mutagen chimic, 5-azacitidina, utilizat experimental mai ales pentru efectul său ca agent de demetilare și implicit pentru inducerea expresiei genice, produce totodată mutații punctiforme, recombinări mitotice și ruperi de cromozomi [A. Roșu, 1999].

23.5.1. Selecția *in vitro* de linii celulare

Acest proces este, în principiu, similar procedeelor de selecție practicate în cazul microorganismelor, dar există și unele particularități ale culturilor de celule vegetale ca, de exemplu, tendința acestora de a forma agregate, ceea ce îngreunează obținerea de clone de la celule individuale. Totodată, creșterea

culturilor celulare este mai lentă, iar culturile de celule vegetale nu sunt monoploide, ca microorganismele, ci constau din populaţii celulare cu grade diferite de ploidie.

Mutaţiile induse la sistemele de culturi de ţesuturi şi de celule vegetale pot fi încadrate în câteva categorii:

– mutante auxotrofe sunt cele care necesită pentru creşterea lor *in vitro* suplimentarea mediului de cultură cu diferite componente chimice pe care celulele nu le pot sintetiza;

– mutante rezistente la diferite substanţe chimice, antimetaboliţi sau condiţii nutriţionale şi de mediu nefavorabile;

– mutante autotrofe care sunt capabile să crească pe medii deficitare în diverse componente chimice şi să sintetizeze unele substanţe care de regulă sunt necesare pentru formele normale;

– alte tipuri de mutante care prezintă însuşiri particulare prin care se deosebesc de liniile parentale, ca pigmentaţie modificată, diferenţe în ce priveşte cantitatea de clorofilă, de antociani, carotenoizi sau alte caracteristici morfologice noi [A. Roşu, 1999].

Ca şi în cazul procedeelor microbiologice, din culturile de celule vegetale stabilite pentru producerea de metaboliţi secundari pot fi izolate şi clonate celule unice. Deoarece populaţia celulară originală este inevitabil heterogenă, există probabilitatea ca unele clone să se remarce prin capacităţi biosintetice care să le depăşească mult pe cele ale celulelor iniţiale, fapt demonstrat experimental în multe cazuri, prin selecţia aşa-numitelor clone celulare înalt-producătoare de anumiţi metaboliţi secundari. Problema care se ridică după izolarea unor astfel de clone celulare vizează stabilitatea însuşirilor acestora. Studii detaliate asupra clonelor stabilite de la celule izolate de la *Catharanthus roseus* au evidenţiat clar deteriorarea în timp a capacităţii acestor clone de a acumula alcaloizii indolici ajmalicina şi serpentina. Dovada instabilităţii biochimice a fost raportată şi în alte cazuri. Astfel, M. Tabata şi colab. (1976) au demonstrat că în culturile de calus de tutun (*Nicotiana rustica*), conţinutul în nicotină a fost redus pe măsura sub-cultivărilor, atingând o valoare minimă la sfârşitul celui de al nouălea pasaj. Alţi autori au raportat pierderea completă a capacităţii de a produce anumite cardenolide de către celulele calusului de *Digitalis purpurea* sau a capacităţii de a produce acid cinnamic în suspensiile celulare de *Capsicum frutescens*. Dimpotrivă, în cazul clonelor celulare de *Catharanthus roseus* producătoare de antociani, capacitatea biosintetică s-a menţinut pe o perioadă de peste 6 luni. Poate cel mai spectaculos exemplu de stabilitate a liniilor celulare este oferit de *Lithospermum*

erythrorhizon, la care s-a raportat producerea de shikonin de către clonele celulare selectate pe perioade de mai mulți ani (tabelul 23.2).

Tabelul 23.2

Culturi de celule vegetale și potențialul lor de a produce metaboliți secundari (după W. Kreis și E. Reinhard, 1988)

a) Culturi celulare înalt producătoare		
Specia vegetală	Metabolitul	Cantitatea [g/l]
Berberis wilsoniae	Iatrorrhizin	3,0
Coleus blumei	Acid rosmarinic	5,5
Coptis japonica	Berberină	1,4
Lithospermum erzthrorhizon	Shikonin	4,0
Morinda citrifolia	Antrachinone	2,5
b) Culturi celulare vegetale recalcitrante		
Atropa belladona	Atropină	
Cinchona ledgeriana	Chinină	
Digitalis lanata	Digoxin	
Duboisia leichhardtii	Hioscinină	
Papaver somniferum	Codeină	
Rauwolfia serpentina	Reserpină	
c) Culturi de celule vegetale care produc metaboliți secundari necunoscuți în planta intactă		
Andrographis paniculata	Paniculide (Sesquiterpene)	
Gardenia jasminoides	Tarennosid (Monoterpene)	
Morinda citrifolia	5,6-Dihidroxilucidin (Antrachinone)	
Ochrosia eliptica	Epchrosin (Alcaloid indolic)	
Picralima nitida	Pericin (Alcaloid indolic)	
Ruta graveolens	Rutacultin (Furanocumarin)	
Stephania cepharantha	Armorin (Alcaloid)	
Thuja occidentalis	Hinokiol (Diterpene)	

Putem trage concluzia că cel puțin în unele cazuri, liniile celulare pot fi stabile și își pot menține capacitatea de sinteză și de acumulare a metaboliților specifici, pe parcursul mai multor subcultivări.

O dată obținută o linie celulară înalt producătoare, aceasta trebuie cultivată în condiții care să optimizeze exprimarea secvențelor metabolismului secundar caracteristic speciei în cauză [M. M. Yeoman și colab., 1996].

23.6. MANIPULAREA METABOLISMULUI SECUNDAR ÎN CONDIŢII *IN VITRO* PRIN MODIFICAREA MEDIULUI FIZIC ŞI CHIMIC

Sinteza şi acumularea de metaboliţi secundari poate fi stimulată prin modificarea condiţiilor de cultură. În general, cercetările privind potenţialul biosintetic al culturilor celulare s-au axat pe calusuri sau pe culturi celulare în suspensie crescute în condiţii de agitare, în vase de cultură cu volum mic. Trecerea culturilor în bioreactoare de volum mare s-a soldat de regulă cu fenomene nedorite, incluzând reducerea creşterii celulare şi a cantităţii de produs final. În consecinţă, au fost definiţi o serie de factori de care depinde modularea metabolismului secundar în concordanţă cu scopul urmărit [M. M. Yeoman şi colab., 1996].

23.6.1. Alegerea sistemului de cultură

Există trei abordări de bază privind sistemele de cultură folosite pentru producerea de metaboliţi secundari în culturi celulare:

1) **Culturi de celule în bioreactoare** – după modelul *batch* într-un singur stadiu sau în două stadii, inspirate de fermentatoarele utilizate pentru cultura microorganismelor. Cu toate că bioreactoarele au diferite design-uri, sunt în principal de două tipuri: a) cu agitare mecanică şi b) cu curent de aer (*air lift*), iar volumul acestora ajunge până la 75 000 litri.

Încă din anul 1959 W. Tulecke şi L. G. Nickell au raportat primul succes în cultivarea celulelor vegetale în suspensie la scară comercială. În această perioadă de început s-au folosit fermentatoare de oţel având volume de până la 134 litri, cu agitare mecanică. Aceste tipuri de fermentatoare prezentau însă dezavantajul că nu asigurau o oxigenare uniformă a mediului de cultură iar în plus structura celulelor era afectată de agitarea mecanică. În consecinţă, s-a impus perfecţionarea sistemului de agitare, cele mai bune rezultate fiind obţinute cu agitatoare helicale cu o viteză de agitare redusă, cuprinsă între 50 şi 200 rpm, sau atunci când agitatoarele mecanice au fost înlocuite cu flux de aer (sistemul *air lift*). Până la ora actuală încă nu s-a obţinut un sistem ideal care să asigure omogenitatea oxigenării şi a disponibilităţii nutrienţilor în întreg volumul de cultură din bioreactoarele de mare capacitate.

Cu toate progresele înregistrate în deceniile care au urmat şi care au vizat atât perfecţionarea sistemelor de fermentatoare, cât şi optimizarea productivităţii culturilor de celule vegetale, se consideră că procesele biotehnologice bazate pe culturi de celule vegetale sunt mult mai costisitoare decât cele microbiene.

Cultivarea în bioreactoare a suspensiilor de celule vegetale trebuie să ţină cont de o serie de particularităţi ale acestora. În primul rând, dimensiunile celulelor vegetale sunt mult mai mari decât cele ale celulelor microbiene, au o rată a creşterii

mai redusă şi tind să formeze agregate de până la 200 celule fiecare în mediile lichide agitate. De regulă, sunt necesare între 20–40 de zile pentru a stabili o cultură de celule vegetale în bioreactoare cu volume cuprinse între 25–5000 litri. În plus, trebuie să se acorde o atenție deosebită menținerii sterilității culturilor pe tot parcursul ciclurilor de producție [W. Kreis şi E. Reinhard, 1989].

Producerea de biomasă celulară rămâne un punct critic pentru productivitatea culturilor în bioreactoare, întrucât s-a constatat că după primele zile de cultură, aproximativ 50% dintre celule îşi pierd viabilitatea. Dacă producerea de metaboliți secundari este asociată cu creşterea celulară se folosesc sistemele de bioreactoare cu fază unică. În cazurile când metaboliții se acumulează intracelular, întreaga biomasă se recoltează pentru extragerea compuşilor secundari, dar dacă metaboliții sunt eliminați în mediul de cultură extracția se realizează fără sacrificarea biomasei celulare, iar sistemele de cultură pot fi continue, în sensul că aceeaşi biomasă celulară este utilizată în mod repetat pentru mai multe cicluri de producție. În condițiile în care producerea de metaboliți are loc la sfârşitul fazei de creştere logaritmică şi în timpul fazei staționare, se folosesc sisteme bifazice, respectiv în prima fază se realizează numai obținerea biomasei celulare, iar în faza a doua de cultură se realizează producerea de metaboliți [F. Bourgaud şi colab., 2001].

2) **Sisteme de cultură cu celule imobilizate** – în care celulele sunt incluse sau sunt ataşate la o matrice inertă, în substrat fluidizat sau fix. În bioreactorele cu substrat fluidizat, celulele sunt incluse într-un gel preparat sub formă de granule sferice, mediul de cultură fiind agitat uşor cu flux de aer. În bioreactoarele cu strat fix celulele imobilizate în gel sunt menținute staționare, dar sunt perfuzate intermitent cu mediu de cultură, care poate fi recirculat ca atare sau poate fi modificat prin adăugarea sau prin înlăturarea unor constituenți.

Sistemele de culturi de celule imobilizate în bioreactoare oferă multe avantaje față de suspensiile celulare libere deoarece mediul chimic poate fi manipulat cu precizie şi pot fi astfel stabilite sisteme de culturi continue sau semicontinue, cu cicluri de producție mult mai eficiente.

3) **Culturi de organe (lăstari sau rădăcini)** – deşi celulele din culturi posedă întregul potențial biochimic al genomului plantei întregi, adesea noile condiții de mediu determină modificări ale metabolismului, exprimate prin tipul şi prin cantitatea metaboliților sintetizați, până la dispariția totală a unora dintre aceştia, sau chiar prin sinteza unor compuşi noi, care nu sunt sintetizați în planta de origine.

O contribuție importantă la depăşirea limitelor cu care se confruntă productivitatea culturilor de celule în suspensie rezidă în tehnica de cultură a țesuturilor şi a organelor diferențiate, ca de exemplu a lăstarilor multipli dezvoltați *in vitro* şi a culturilor de rădăcini, inclusiv a rădăcinilor transformate cu tulpini de *Agrobacterium rhizogenes*.

S-a constatat că incapacitatea unor culturi celulare da a sintetiza anumiţi compuşi nu este rezultatul pierderii potenţialului biochimic, ci se datorează faptului că acest potenţial se exprimă numai în anumite condiţii, pe parcursul diferenţierii biochimice şi citochimice, şi că adesea nu se poate decupla diferenţierea biochimică de cea morfologică.

În consecinţă, s-a ajuns la concluzia că atunci când metaboliţii secundari sunt produşi în organele aeriene ale plantei se recomandă utilizarea culturilor de lăstari multipli pentru producerea acestora. Sunt de menţionat productivităţile ridicate de metaboliţi secundari înregistrate în culturile *in vitro* de lăstari multipli de la *Catharanthus roseus* pentru producerea substanţelor cu efect antineoplastic – vinblastin şi vincristin –, ca şi cele pentru producerea de codeină la *Papaver somniferum* sau de glicozide cardiace în lăstarii multipli dezvoltaţi *in vitro* la *Digitalis*.

Atunci când metaboliţii secundari sunt sintetizaţi în sistemul radicular al plantei, se recomandă utilizarea de rădăcini pentru producerea acestora. O cultură de rădăcini, transformate sau netransformate, poate fi definită ca fiind aceea în care producerea de biomasă se realizează sub forma de structuri radiculare organizate.

Spre deosebire de studiile privind culturile de rădăcini transformate care sunt de dată mai recentă, culturile de rădăcini normale au fost stabilite încă din 1934, datorită cercetărilor de pionierat ale lui White, care a demonstrat că pot fi stabilite culturi de rădăcini de tomate cu creştere activă *in vitro*, cu mult înainte de experimentarea culturilor de calus cu creştere neorganizată sau a culturilor celulare în suspensie.

În culturi de rădăcini s-a realizat producerea de compuşi bioactivi în cazul multor specii, ca de exemplu producerea de saponine în cantităţi semnificative la *Panax ginseng*, dar culturile de rădăcini transformate au un potenţial superior.

23.6.2. Limitarea nutrienţilor

S-a demonstrat în multe cazuri că metaboliţii secundari se acumulează în fazele târzii ale ciclului de creştere în culturi, de regulă atunci când diviziunile celulare încetează, acest proces fiind asociat cu diferenţierea celulară.

Unele rezultate experimentale menţionează efectul pozitiv al stresului nutriţional asupra biosintezei unor metaboliţi specifici, întrucât în aceste condiţii se reduc creşterea celulară şi rata metabolismului primar, iar în schimb sunt stimulate diferenţierea celulară şi rata metabolismului secundar. De altfel, este cunoscut faptul că pe parcursul unor secvenţe ale metabolismului primar şi secundar există competiţii pentru precursori comuni, astfel că dacă nu sunt condiţii de cultură optime pentru sintetizarea polimerilor necesari creşterii şi diviziunilor celulare, precursorii sunt dirijaţi spre căile metabolismului secundar.

În consecinţă, orice manipulare a mediului de cultură care inhibă creşterea şi multiplicarea celulelor, deci reducerea ratei metabolismului primar, va stimula diferenţierea celulară şi capacitatea celulelor de a acumula metaboliţi secundari.

Întrucât azotul este esențial pentru sinteza de proteine și de acizi nucleici, reducerea azotului din mediul de cultură a avut ca rezultat creșterea nivelului metabolismului secundar, prin instalarea unei faze staționare premature. Totodată reducerea cantității de fosfat din mediu a condus la producerea unei cantități ridicate de alcaloizi în culturile de calus de la *Peganum harmala* sau la acumularea de putrescine în culturi de calus de la tutun.

S-a demonstrat, totodată, și efectul benefic al concentrației de sucroză asupra sintezei de metaboliți secundari, ca de exemplu asupra acumulării de nicotină în celulele de tutun, de polifenoli în celulele de *Rosa*, de solasodină în culturi de calus de *Solanum nigrum* sau de antociani în culturi în suspensie de la *Vitis vinifera*.

Toate aceste constatări vin în sprijinul ideii că există un raport invers între aspectele majore ale metabolismului primar și cele ale biosintezei și acumulării de metaboliți secundari, datorită utilizării diferențiate și antagoniste a unor precursori comuni.

23.6.3. Reglatorii creșterii

Importanța utilizării unei concentrații corespunzătoare de auxine și citochinine în mediul de cultură pentru a induce creșterea proliferativă și dezvoltarea de calus de la un explant este foarte bine evidențiată de numeroase date experimentale.

Fără îndoială că raportul dintre tipurile de reglatori ai creșterii introduși în compoziția mediului de cultură va influența și metabolismul secundar. În general, factorii care stimulează diferențierea structurală, respectiv dezvoltarea de lăstari și de rădăcini din calus, vor influența și profilul biochimic.

S-a constatat, de pildă, că regenerarea de rădăcini din calus tinde în cazul multor specii să fie acompaniată de o creștere accentuată a conținutului de alcaloizi. Totodată, s-a constatat că nu întotdeauna concentrațiile de reglatori ai creșterii care induc rate ridicate ale creșterii biomasei celulare determină și acumulări semnificative de metaboliți secundari. Astfel, în culturile celulare în suspensie de la *Beta vulgaris*, la concentrații optime de auxine, se sintetizează betalaine pe tot parcursul ciclului de creștere, fenomen evidențiat prin intensificarea culorii culturii. Dacă se mărește concentrația auxinei în mediul de cultură acumularea de betalaine este represată și cultura devine incoloră.

Manipularea reglatorilor creșterii în mediul de cultură și-a dovedit pe deplin eficacitatea în stimularea acumulării de alcaloizi în culturi celulare de *Catharanthus roseus*, *Thalictrum minus* și *Rauwolfia serpentina*, de shikonin – în culturi celulare de *Lithospermum erythrorhizon*, sau de berberin – în culturi de *Coptis japonica*.

23.6.4. Elicitarea

O altă abordare menită să modifice mediul în care cresc culturile celulare în scopul producerii unui anumit metabolit secundar este elicitarea.

Studiile privind relaţia celule vegetale – microorganisme patogene au evidenţiat faptul că în urma invaziei microbiene au loc modificări ale metabolismului celulelor plantei, exprimate prin acumularea de metaboliţi secundari care au activitate antimicrobiană din categoria fitoalexinelor. Aceşti compuşi sunt descrişi ca *elicitori* şi, împreună cu aşa-numiţii elicitori endogeni sau constitutivi ai plantei gazdă, alcătuiesc grupul de *elicitori biotici*. Totodată, stresul fizic şi chimic, de tipul radiaţiilor UV, expunerea la temperaturi ridicate sau scăzute, etilena, fungicidele, antibioticele, concentraţiile ridicate de săruri etc. alcătuiesc grupul *elicitorilor abiotici*.

S-a demonstrat că o serie de elicitori derivaţi de la microorganisme determină creşteri ale biosintezei şi acumulării de metaboliţi secundari în culturi celulare. De exemplu, o fracţie de carbohidraţi izolată de la drojdii poate să inducă sinteza de izomeri gliceolinici în culturi celulare de *Glicine max* sau creşterea sintezei de berberină în culturi de *Thalictrum rugosum*.

Elicitorii fungici modifică dramatic metabolismul fenilpropanoizilor în multe culturi celulare, inclusiv cele de *Capsicum frutescens*, ca şi metabolismul unor alcaloizi. Totodată, elicitori fungici de la *Botrytis* au influenţat substanţial producerea unui alcaloid important, sanguinarina, în culturi celulare de la *Papaver somniferum*.

23.6.5. Utilizarea precursorilor

Creşterea cantităţii de metaboliţi secundari produşi în sisteme biotehnologice rămâne o problemă majoră pentru comercializarea acestora la preţuri competitive.

Una dintre metodele utilizate pentru creşterea cantităţii compuşilor secundari vizează introducerea în mediul de cultură a precursorilor unor compuşi specifici. De exemplu introducerea în mediul de cultură a unor precursori ca acid ferulic, vanililamină sau acid isocapric determină creşterea producţiei de capsaicină în culturi celulare de *Capsicum frutescens*; introducerea de colesterol în mediul de cultură al celulelor de *Dioscorea deltoidea* determină creşterea semnificativă a cantităţii de diosgenină sintetizată în cultură; iar fenilalanina induce dublarea cantităţii de acid rosmarinic produs în culturi celulare de *Coleus blumei*.

23.6.6. Lumina, *p*H-ul, temperatura şi mediul gazos

Lumina, prin intensitate, spectru şi durata de iluminare, este un factor esenţial pentru acumularea de compuşi secundari în multe tipuri de culturi celulare,

*p*H-ul optim pentru creşterea celulară este cuprins între 5,5 şi 6, iar temperatura optimă este de 20...25°C.

S-a demonstrat că *p*H-ul mediului de cultură poate influenţa absorbţia de nutrienţi şi de precursori, modifică permeabilitatea membranelor şi determină eliberarea metaboliţilor din vacuole în mediul de cultură.

Culturile celulare de *Catharanthus* crescute în diferite regimuri de temperatură au prezentat variaţii pronunţate în acumularea de metaboliţi secundari, fenomen constatat şi în multe alte cazuri. Totodată aerarea mediului de cultură constituie un factor critic pentru succesul producerii de compuşi secundari la scară comercială.

23.7. CULTURI DE RĂDĂCINI FIROASE (*HAIRY ROOTS*) OBŢINUTE PRIN TRANSFORMARE CU *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*

Boala rădăcinilor firoase este provocată la dicotiledonate de tulpini virulente de *Agrobacterium rhizogenes* şi se caracterizează prin proliferarea de rădăcini adventive la situsul de infecţie.

Virulenţa bacteriei este asociată cu o plasmidă de dimensiuni mari (180–240 kb), numită plasmida Ri (*root inducing*). În procesul infecţiei, o copie a ADN-T din plasmida Ri este integrată stabil în genomul celulelor plantei, pe care le transformă, determinând fenotipul neoplastic caracteristic al rădăcinilor de tip *hairy*. Celulele acestui tip de neoplasm se caracterizează prin modificarea stabilă a modului de creştere, exprimată prin independenţă faţă de hormonii exogeni şi prin însuşirea de a sintetiza metaboliţi noi, de tipul opinelor, care servesc drept nutrienţi specifici pentru tulpinile oncogene de *Agrobacterium*.

Opinele sunt derivaţi specifici ai aminoacizilor esenţiali, pe care bacteriile le utilizează ca surse de carbon, de azot şi de energie, astfel că prin transformarea neoplastică bacteriile îşi creează o nişă ecologică utilizând capacităţile biosintetice şi energetice ale celulelor plantei, printr-o strategie unică de parazitism, realizată prin transformare genetică naturală a celulelor vegetale. Cooperarea dintre genele care controlează sinteza de opine în celulele transformate ale plantei şi genele care catabolizează opinele aflate în plasmida bacteriei care a indus transformarea constituie elementul central al conceptului de *colonizare genetică*.

Rădăcinile firoase dezvoltate ca răspuns la infecţia cu *Agrobacterium rhizogenes* pot servi la stabilirea de culturi de rădăcini în condiţii aseptice, întrucât fenotipul *hairy* este stabil în cultură, rata creşterii este mult mai rapidă decât a rădăcinilor normale şi au un potenţial nelimitat de creştere pe medii de cultură fără hormoni, vitamine sau alţi compuşi organici, cu excepţia unei surse de carbon.

Totodată, rădăcinile firoase produc o gamă largă de compuşi fitochimici importanţi, iar dacă ele derivă de la plante cu capacităţi biosintetice ridicate, aceste însuşiri se exprimă şi la nivelul rădăcinilor firoase.

Potenţialul biosintetic al culturilor de rădăcini poate fi manipulat prin elicitare, folosind elicitori abiotici sau biotici, prin obţinerea de culturi de rădăcini fotoautotrofe, prin selecţia de clone radiculare caracterizate prin capacităţi biosintetice ridicate sau prin aplicarea tehnicilor genetice care permit modelarea căilor metabolice în sensul producerii anumitor compuşi bioactivi în concentraţii dorite.

Culturile de rădăcini firoase se caracterizează prin stabilitatea însuşirilor biosintetice pe perioade lungi de timp, pot fi crescute în medii lichide sau semisolide şi pot constitui surse continue de metaboliţi, produşi în concentraţii apreciabile în bioreactoare [F. Bourgaud şi colab., 1997].

23.8. MANIPULAREA GENOMULUI FOLOSIND TEHNOLOGIA ADN RECOMBINANT

Pe lângă posibilitatea selecţiei de linii celulare şi stabilirii de clone cu capacităţi crescute de biosinteză şi de acumulare de metaboliţi secundari în sisteme biotehnologice, tehnicile moleculare permit obţinerea de celule şi de plante modificate genetic, la nivelul cărora se poate realiza dirijarea unor procese metabolice.

Trei aspecte ale modificărilor genetice sunt în mod special relevante pentru sinteza şi acumularea de metaboliţi secundari în culturi de celule vegetale:

a) reglarea expresiei genelor care codifică enzime-cheie ale metabolismului secundar;

b) manipularea metabolismului secundar prin adăugarea de gene noi;

c) manipularea metabolismului secundar prin utilizarea tehnologiei ARN antisens.

S-a demonstrat că metabolismul secundar este puternic influenţat de factori ai mediului precum lumina, temperatura, *p*H-ul, aerarea, elicitorii, sau de rănirea mecanică a celulelor din culturi. Totodată, sinteza multor metaboliţi secundari este restrânsă la anumite tipuri celulare, ţesuturi sau organe. Prin identificarea unor gene reglatoare specifice, se creează posibilitatea activării expresiei acestora, şi ca urmare se poate induce sinteza unui anumit metabolit secundar în culturi celulare prin intermediul enzimelor – cheie.

Introducerea de gene noi a fost experimentată cu succes la *Petunia hybrida*. Gena de la porumb care codifică enzima dihidro-quercetin-4-reductaza (DQR) nu este prezentă la *Petunia*, dar prin exprimarea genei transferate de la porumb, enzima corespunzătoare a utilizat metabolitul endogen dihidrokaempferol

pentru a fi sintetizat în final pigmentul roşu pelargonidin, care în mod normal nu se acumulează în celulele de *Petunia.*

Primul exemplu de manipulare a metabolismului secundar la plante prin folosirea tehnologiei ARN antisens a fost raportat în 1988 de către Krol şi colab., prin modificare culorii florilor de *Petunia hybrida.*

Culorile petalelor se datorează în principal flavonoizilor, betalainelor şi carotenoizilor, dar pigmenţii specifici din categoria flavonoizilor au fost cel mai mult studiaţi şi un număr de gene care codifică enzime implicate în biosinteza flavonoizilor au fost izolate şi caracterizate. În special chalcone sintaza (CHS), prima enzimă a căii fenilpropanoide de biosinteză a antocianilor, a fost aleasă pentru manipulări genetice. Prin transformarea plantelor de *Petunia* cu o genă antisens „chs", tipul sălbatic de pigmentaţie a fost perturbat, realizându-se la nivelul transformanţilor diferite niveluri şi modele de pigmentaţie, tehnică ce a fost ulterior aplicată şi la alte specii ornamentale ca, de exemplu, trandafirul, garoafele, gerbera şi crizantema.

23.9. INGINERIA METABOLICĂ LA PLANTE

Ingineria metabolică a apărut ca o nouă disciplină după 1990 şi este definită ca redirecţionarea uneia sau mai multor reacţii enzimatice pentru a produce noi compuşi într-un organism, pentru a îmbunătăţi producerea compuşilor existenţi sau pentru a media degradarea unor compuşi. Acest nou domeniu îşi propune ameliorarea activităţilor celulare prin manipularea funcţiilor enzimatice, de transport şi reglatoare la nivel celular, utilizând tehnologia ADN recombinant [D. DellaPenna, 2001].

Un succes din domeniul ingineriei metabolice la plante poate fi exemplificat prin utilizarea ultimei enzime implicate în sinteza de alfa-tocoferol, şi anume gama-tocoferol metil transferaza, pentru creşterea activităţii vitaminei E la Arabidopsis. Ingineria unor conversii similare la soia, canola şi porumb va avea consecinţe pozitive asupra sănătăţii consumatorilor, întrucât vitamina E este un antioxidant important pentru dieta zilnică.

Un alt exemplu de inginerie metabolică este ilustrat prin modificarea metabolismului carotenoizilor în endospermul boabelor de „orez auriu". Deficienţa în vitamina A constituie o problemă serioasă pentru sănătatea oamenilor din unele zone ale globului, unde orezul constituie baza alimentaţiei. Trei gene care codifică enzime implicate în metabolismul carotenoizilor – două provenind de la plante (gena pentru fitoensintază şi cea pentru licopenciclază de la narcise) şi una de la bacterii (gena pentru o desaturază de la *Erwinia*) – au fost „inginerite" pentru expresie simultană în endospermul orezului. Prima generaţie de plante transgenice de orez au sintetizat în celule endospermului cantităţi crescute de beta-caroten, care

asigură 10% din necesarul zilnic de vitamina A prin consumul unei cantităţi moderate de boabe.

Aceste exemple ilustrează faptul că este acum posibilă manipularea producerii de carotenoizi şi a altor compuşi importanţi pentru alimentaţie prin utilizarea ingineriei metabolice.

23.10. AGRICULTURA MOLECULARĂ

Plantele pot servi şi ca organisme-gazdă pentru producerea de proteine recombinante, respectiv producere de molecule vaccinale sau terapeutice în celulele plantelor transgenice.

Imunizarea orală prin intermediul „vaccinurilor comestibile" constituie realizări recente de excepţie în domeniul transgenezei. Crearea acestor vaccinuri implică transferul unor gene de la agentul infecţios (virusuri, bacterii) la plante. Planta transgenică sintetizează o subunitate a agentului infecţios, adică o proteină care nu poate produce îmbolnăvirea, ci acţionează ca antigen caracteristic pentru agentul patogen respectiv, inducând imunitatea prin sinteza de anticorpi împotriva agentului infecţios respectiv.

Întrucât imunizarea orală elimină operaţiile de purificare a vaccinurilor şi de injectare a acestora, această metodă de vaccinare este larg promovată în prezent ca o alternativă potenţială la terapia medicamentoasă sistemică.

Succesul acestor experienţe depinde însă de un fenomen complex care se petrece în celulele producătoare, şi anume de „maturarea proteinelor", care se realizează în urma prelucrării post-translaţionale în urma căreia aceste molecule devin biologic active. După traducerea mesajului genetic purtat de ARN mesager într-un lanţ de aminoacizi, noua proteină îşi schimbă conformaţia spaţială şi primeşte elemente non-peptidice, cum sunt grupările fosfat sau glucidele. Aceste modificări post-translaţionale sunt adesea specifice tipului de celulă şi speciei, şi ca urmare nu se pot produce aceleaşi proteine-vaccin într-o bacterie, într-o celulă vegetală, într-un fung filamentos sau într-o celulă de la mamifere.

Între modificările post-translaţionale adesea necesare pentru a asigura funcţionarea şi stabilitatea unei proteine, glicozilarea este una dintre cele mai importante.

În esenţă, glicozilarea presupune legarea de oligozaharide, care conţin câteva unităţi glucidice, la o proteină, care astfel devine o glicoproteină. În prezent nu există nici un sistem celular capabil să copieze identic structurile oligozaharidelor dintr-o glicoproteină naturală de la mamifere.

Maturarea tuturor proteinelor începe în reticulul endoplasmic, se continuă la nivelul aparatului Golgi şi se încheie fie prin stocarea glicoproteinei respective într-o vacuolă, fie prin eliminarea acesteia în afara celulei.

La plante şi la alte eucariote glicozilarea începe în reticulul endoplasmic prin asocierea la polipeptida în curs de sinteză a unui glican care se fixează pe asparagină, în mai multe puncte ale lanțului proteic. Acest precursor oligozaharidic numit N-glican (deoarece se leagă la gruparea aminică a asparaginei) prezintă aceeaşi structură la toate eucariotele: este ramificat şi conține 3 glucoze + + 9 manoze + 2 N-acetilglucozamine. Această structură inițială este prelucrată cu ajutorul a numeroase enzime din categoria glicosidazelor şi glicoziltransferazelor. Acestea din urmă acționează la nivelul aparatului Golgi şi sunt specifice plantelor, ceea ce face ca glicanii din celulele vegetale să nu fie echivalenți cu cei din celulele animale.

La plante, la insecte şi la moluşte, la molecula de glicoproteină se ataşează adesea xiloză şi fucoză, în timp ce la mamifere se ataşează acid sialic. Aceste diferențe constituie principalul obstacol în utilizarea proteinelor recombinate produse în celulele vegetale în scopuri terapeutice, întrucât pot induce reacții alergice la persoanele cărora le sunt administrate. Dacă se injectează o glicoproteină vegetală la un mamifer, se produc anticorpi dirijați tocmai contra resturilor de xiloză şi fucoză ale N-glicanilor.

Pentru evitarea unor astfel de reacții alergice se procedează la modificarea genomului celulei vegetale în sensul de a-l „umaniza", adică celulele plantei să poată produce glicani de tipul celor de la mamifere. Deja se experimentează pe celule vegetale crescute în bioreactoare metode de modificare a glicozilării pe parcursul procesului de maturare a proteinelor pentru obținerea de glicani „umanizați". Pentru aceasta se transferă în celulele plantelor gene de la mamifere, în special cele care codifică sialiltransferazele şi deci catalizează adăugarea acidului sialic la glicani.

În viitor, „agricultura moleculară" va permite producerea unor cantități importante de proteine terapeutice în produsele agricole, reducându-se investițiile în fabrici farmaceutice costisitoare.

Industria **nutraceutică** reprezintă, de asemenea, un domeniu nou în care biotehnologia se combină cu agricultura pentru obținerea de produse cu un efect benefic potențial asupra sănătății. În **nutraceutice**, sau **alimente funcționale**, constituenții fitochimici, care de regulă au rol nutrițional în dietă, pot demonstra pe termen lung şi valoare medicinală.

În general, progresul din domeniul ingineriei metabolice, al agriculturii moleculare şi al celorlalte abordări recente ale biotehnologiei vegetale este condiționat de cunoaşterea aprofundată a bazelor celulare şi moleculare ale unor procese fundamentale din lumea plantelor, precum: creşterea, dezvoltarea, diferențierea, morfogeneza, totipotența şi metabolismul. Având în vedere însă cei 100 000 de compuşi unici estimați a fi sintetizați în regnul vegetal, elucidarea acestor procese fundamentale, ca o condiție esențială a exploatării în folosul umanității a extraordinarului potențial oferit de „lumea tăcută a plantelor", constituie o adevărată provocare pentru comunitatea ştiințifică.

23.11. CERCETĂRI ORIGINALE PRIVIND PRODUCEREA DE METABOLIŢI SECUNDARI ÎN CULTURI *IN VITRO* LA *Rubia Tinctorum*

Cercetările privind biosinteza unor metaboliţi secundari de interes farmaceutic prin culturi celulare au evidenţiat faptul că în multe cazuri sinteza şi acumularea metaboliţilor secundari sunt dependente de anumite procese biochimice şi de diferenţieri morfologice. Aşa cum în planta intactă compuşii secundari se acumulează în rădăcini, fructe, lăstari, saci glandulari, canale pentru uleiuri eterice etc., şi în cazul culturilor de ţesuturi şi de celule de la unele specii biosinteza metaboliţilor specifici este în mod obligatoriu corelată cu un anumit nivel al diferenţierii celulare şi tisulare.

Limitele întâmpinate până nu demult, reprezentate în principal de cantităţile reduse ale compuşilor secundari produse în culturile de celule nediferenţiate, sunt depăşite în prezent datorită noilor tehnologii de inginerie genetică, în special prin posibilitatea inducerii diferenţierii tisulare şi organogene de tipul rădăcinilor „hairy", ca urmare a infecţiei experimentale cu *Agrobacterium rhizogenes*. Studiul funcţiei genelor „rol" prezente în ADN-T al plasmidei Ri şi în special al genei *rol B* au evidenţiat faptul că aceasta acţionează ca un factor morfogen component al complexului receptor al stimulilor hormonali, care declanşează o reacţie în cascadă, concretizată prin inducerea de meristeme, de la care se pot dezvolta nu numai rădăcini, ci şi alte tipuri de organe, ca lăstari şi frunze.

Explantele transformate cu *A. rhizogenes* pot regenera spontan plante ce prezintă modificări morfologice cărora li s-a atribuit termenul de „sindromul *hairy roots*", constând din: frunze cutate, internoduri scurte, dominanţă apicală redusă, dar mai ales dezvoltarea unui sistem radicular abundent, rădăcinile transformate remarcându-se printr-un geotropism redus.

Rădăcinile firoase induse de *A. rhizogenes* se caracterizează prin ramificări pronunţate, densitate mare şi prin capacitate biosintetică superioară culturilor celulare nediferenţiate. În gama largă de substanţe fitochimice produse de rădăcinile transformate, din categoria alcaloizilor, cumarinelor, poliacetilenelor, sesquiterpenelor, naftochinonelor, taninurilor etc., au fost deja identificaţi compuşi cu efect farmaceutic, nematocid sau insecticid. Un alcaloid piperidonic rar, hialbidona, a fost detectat în culturi de *Hyosciamus albus*, iar un grup nou de polihidroxialcaloizi, numit calistegine, a fost identificat în culturi de rădăcini firoase de la *Atropa belladona*. La *Catharanthus roseus*, pe lângă derivaţii indolici ajmalicina şi catharanthina, a fost evidenţiată prezenţa vindolinei, în cantităţi de

câteva ori mai mari decât cele izolate din culturi celulare. Optimizarea acestui sistem biosintetic este în prezent în atenția cercetătorilor, deoarece vindolina este unul dintre monomerii necesari pentru biosinteza medicamentului anti-leucemic vinblastin (M. J. C. Rhodes și colab., 1990).

Având in vedere potențialul biosintetic de excepție al rădăcinilor transformate cu tulpini de *A. rhizogenes,* demonstrat experimental în cazul multor specii de interes farmaceutic, cercetările noastre au vizat o specie mai puțin studiată din această perspectivă, dar recunoscută pentru capacitatea superioară de a sintetiza antrachinone, *Rubia tinctorum* L.

Rubia tinctorum, împreună cu alte câteva specii de interes tinctorial: *R. cordifolia, R. peregrina, R. fruticosa, R. munjista,* sunt membri ai familiei *Rubiaceae,* în rădăcinile cărora antrachinonele se acumulează sub formă de glicozizi.

Denumită popular roibă, *Rubia tinctorum* crește pe un areal larg, atât în climatul temperat cât și în cel subtropical (fig. 23.1). Rădăcinile plantei au fost utilizate de secole nu numai pentru pigmentul roșu stabil pe care îl conțin, și care a fost utilizat pentru colorarea firelor de lână, ci și în medicina populară, pentru efectul homeostatic și de ameliorare a tulburărilor digestive și a afecțiunilor renale.

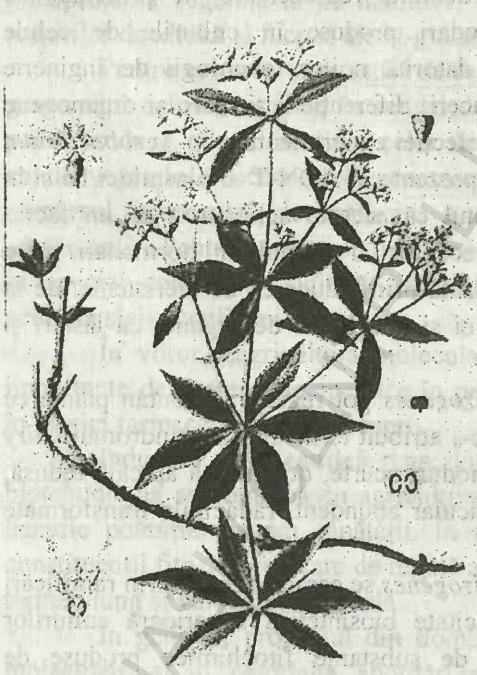


Fig. 23.1. *Rubia tinctorum.*

Compușii fitochimici de interes, antrachinonele, sunt substanțe stabile la temperaturi ridicate și la lumină. Dintre acestea, alizarina (1,2-dihidroxi-antrachinona), purpurina, xantopurpurina și acidul ruberithric constituie la *Rubia tinctorum* elementele majore responsabile de însușirile colorante (A. Vasconsuelo și colab., 2004).

În cercetările noastre, pentru transformarea genetică a explantelor de *Rubia tinctorum* au fost utilizate tulpini sălbatice virulente de *Agrobacterium rhizogenes.* Materialul vegetal supus transformării a constat din vârfuri de lăstari detașați din culturi morfogenetice stabilite *in vitro* pe mediul bazal Murashige și Skoog (1962), suplimentat cu 2 mg/l benzil-aminopurină.

Tulpina bacteriană a fost crescută timp de 48 ore la 28°C, în întuneric, pe mediul AP. Culturile au fost colectate şi resuspendate în mediul Murashige Skoog (MS) cu concentraţia sărurilor redusă la jumătate, densitatea celulelor bacteriene fiind ajustată la aproximativ 5 × 100 miliarde/ml.

Partea bazală secţionată a lăstarilor de Rubia a fost menţinută în suspensia bacteriană timp de 30 minute, după care lăstarii au fost plasaţi între două foi de hârtie filtru umectate, incubarea având loc în condiţii sterile, la 25°C, în întuneric, timp de trei zile. Lăstarii au fost apoi inseraţi cu partea bazală într-un mediu MS agarizat fără hormoni, suplimentat cu 500 mg/l antibiotic (Cefotaxim) şi incubaţi la 25°C, cu o fotoperioadă de 16/8 h.

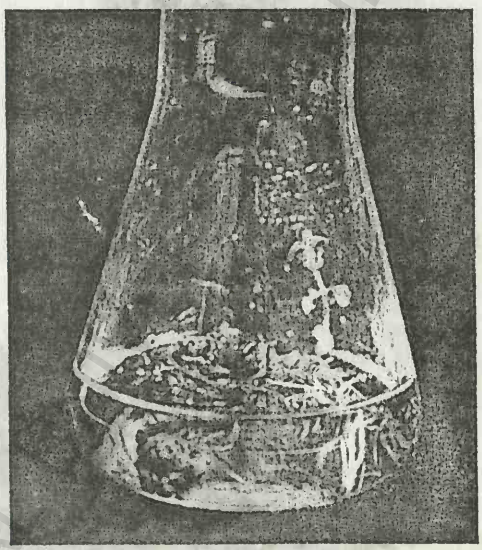


Fig. 23.2. Rădăcini şi lăstari dezvoltaţi de la explante transformate cu *Agrobacterium rhizogenes*.

La primele două transferuri efectuate la intervale de trei săptămâni, concentraţia de antibiotic din mediu a fost redusă la 400 şi respectiv 300 mg/l. După două săptămâni de cultură pe mediul bazal fără hormoni, s-a remarcat că la situsul de infecţie se dezvoltă atât rădăcini, cât şi lăstari (fig. 23.2), de la care pot fi regenerate cu uşurinţă plante autonome.

Comparativ cu planta netransformată (fig. 23.3, *a*), plantele regenerate de la materialul transformat au prezentat o serie de modificări morfologice specifice „sindromului *hairy roots*" la nivelul frunzelor, al internodurilor (fig. 23.3, *b*), dar mai ales la nivelul sistemului radicular, constituit din numeroase rădăcini subţiri, de culoare roşie, cu un conţinut ridicat de pigment (fig. 23.3, *c*).

Explante prelevate din frunzele şi din internodurile plantelor transformate au fost inoculate pe mai multe variante de medii de cultură (MS), cu suplimente hormonale care să stimuleze proliferarea celulară şi dezvoltarea de calus, dintre care au fost alese cele optime:

- V1 – 2 mg/l acid naftil-acetic
  – 1 mg/l kinetină;
- V2 – 0,5 mg/l acid naftil-acetic
  – 0,1 mg/l kinetină;
- V3 – 2 mg/l acid naftil acetic
  – 0,5 mg/l kinetină
  – 20 mg/l acid indolil-acetic
  – 0,1 mg/l benzil-amino-purină.

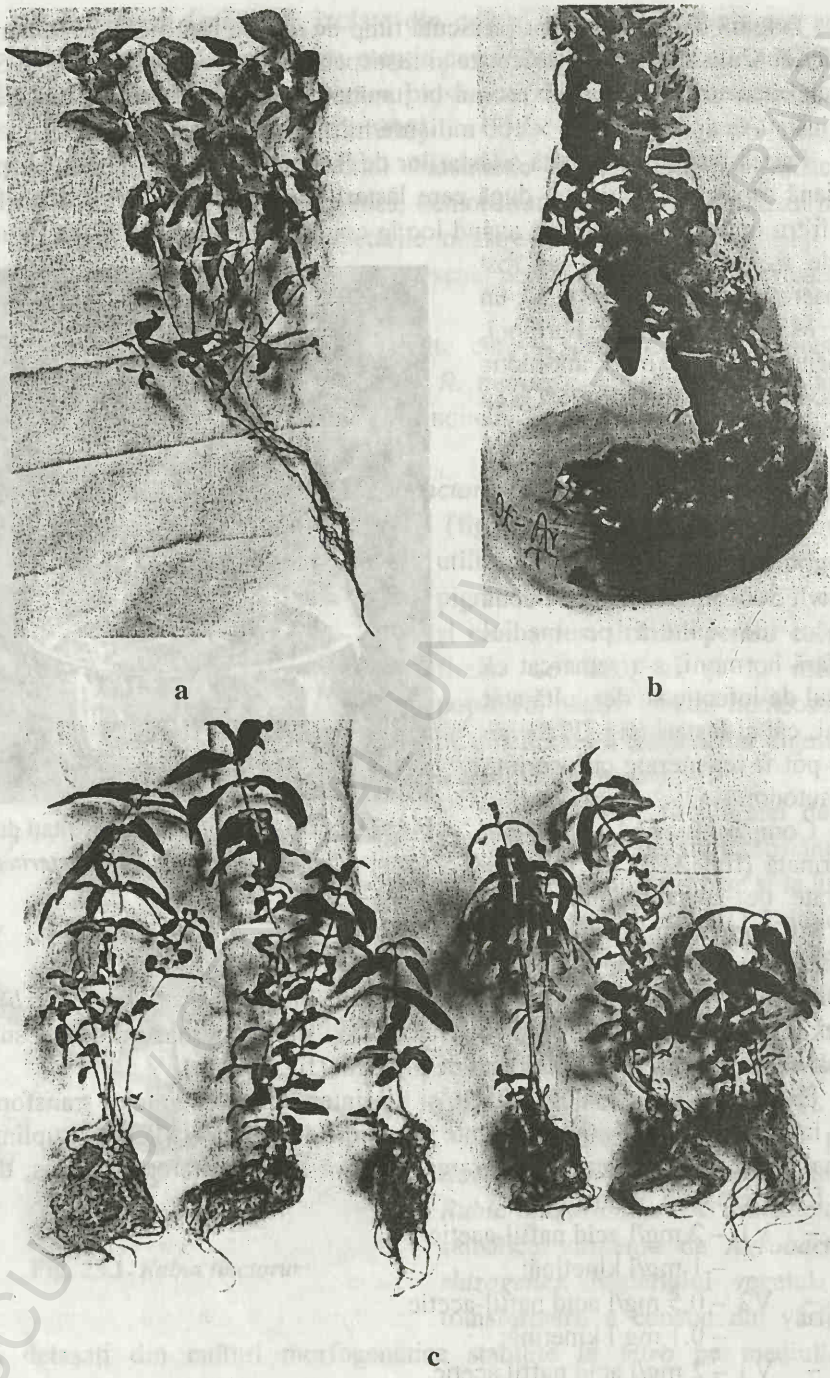
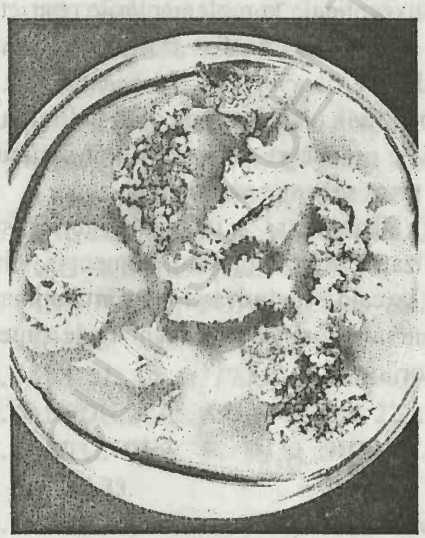


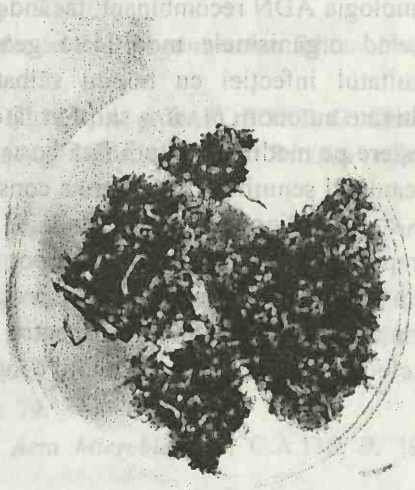
Fig. 23.3. Particularități morfologice specifice „sindromului hairy roots" la nivelul părții aeriene (*b*) și al sistemului radicular (*c*), comparativ cu planta netransformată (*a*).

Calusurile dezvoltate de la explantele transformate au demonstrat o capacitate morfogenetică pronunţată, exprimată prin dezvoltarea de numeroase rădăcini, atât pe mediu lichid (fig. 23.4, *a*), cât şi pe mediu solid (fig. 23.4, *b, c*). Culoarea calusului a fost pronunţat galben portocalie, cu insule de culoare roşie, caracteristici care s-au menţinut neschimbate pe parcursul transferurilor efectuate la intervale de 3 săptămâni, pe medii proaspete.

a



b



c

Fig. 23.4. Morfogeneză din calus pe mediu lichid (*a*) şi agarizat (*b, c*).

Conținutul ridicat în principii active a fost evidențiat prin colorarea în roșu intens a unor fire de lână, efectuată într-un extract apos simplu din biomasa celulară transformată. Pentru aceasta, 10 g biomasă a fost fiartă în 50 ml apă timp de 30 minute, după care se adaugă 1 g fire de lână, care se fierb în extractul apos timp de încă 15 minute.

Rezultatele noastre experimentale permit conturarea următoarelor concluzii:

1) Specia *Rubia tinctorum* demonstrează o capacitate pronunțată de biosinteză a metaboliților secundari de interes, respectiv antrachinone, atât în celulele calusului cu creștere neorganizată cât și în structurile organizate dezvoltate de la acesta;

2) Deși în condiții naturale pigmentul este prezent numai în rădăcină, unde se acumulează în cantități suficiente numai la plantele în vârstă de minimum 3 ani, în condiții *in vitro* culturile celulare inițiate din orice țesut al plantei (mezofil, lăstar, rădăcină) manifestă aceeași totipotență biochimică, exprimată prin biosinteza pe termen lung a metaboliților secundari de interes practic; în consecință, potențialul biosintetic al celulelor vegetale cultivate *in vitro* poate fi exploatat pentru producerea metaboliților secundari de interes în sistem neconvențional.

3) Inducerea diferențierii tisulare și organogene în urma transformării induse de *Agrobacterium rhizogenes* creează premisa producerii substanțelor fitochimice din categoria antrachinonelor în bioreactoare, în flux continuu și în cantități ridicate; un avantaj foarte important al experimentelor de transformare care au ca rezultat inducerea fenotipului rădăcinilor firoase constă în faptul că acest fenotip este rezultatul unui sistem natural de transformare care nu implică tehnologia ADN recombinant, făcând astfel excepție de la reglementările restrictive privind organismele modificate genetic; rădăcinile transformate experimental, rezultatul infecției cu tulpini sălbatice de *Agrobacterium rhizogenes*, pot fi cultivate autonom *in vitro* sub formă de clone radiculare, cu potențial nelimitat de creștere pe medii de cultură fără hormoni și de producere a metaboliților secundari în cantități semnificative pentru a considera procesul ca randamental.

4) Pigmenții antrachinonici roșii (alizarina și acidul ruberithric) sunt compuși termostabili, astfel încât pot fi utilizați și drept coloranți alimentari, chiar și în cazul produselor care sunt procesate la cald, venind astfel în întâmpinarea cerințelor crescânde ale pieței pentru înlocuirea coloranților alimentari de sinteză, cu efecte nedorite asupra sănătății consumatorilor.

BIBLIOGRAFIE

1. **ACOSTA, N., BELDARRAÍN, A., RODRÍGUEZ, L. şi ALONSO, Y.** *Characterization of recombinant invertase expressed in methylotrophic yeasts.* Biotechnol. Appl. Biochem, 2000, 32, pp. 179-187.
2. **ADLER, R. G.** *Biotechnology as an intellectual property.* Science, vol. 223, No. 4647, 1984, pp. 357-363.
3. **AHARONOWITZ, Y. şi COHEN, G.** *The microbiological production of pharmaceuticals.* Sci. Am., 245 (9), 1981, pp. 140-152.
4. **AIBA, S., HUMPHRY, A. S. şi NANCY, M. F.** *Biochemical Engineering*, Academic Press, Inc. New York and London, 1993.
5. **AIBA, S., KITAI, K. şi IMANAKA, T.** *Cloning and expression of thermostable α-amylase gene from Bacillus stearothermophilus in Bacillus stearothermophilus and Bacillus subtilis.* Appl. Environ. Microbiol. 46, 1983, p. 1059.
6. *Ajinomoto Co. Inc.* Jpn., Jpn. Kokai Tokkyo Koho, Bv. no. 6135797, 1986.
7. **AKIMKINA, T. V.** *Mol. Biol.* Moscova, 26(2), 1992, pp. 418-423.
8. **ALFERMANN, A. W.** *Natural product formation by plant cell biotechnology.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 43, 1995, pp. 199–205.
9. **ALIHONIAN, S. Y.** *Bazele genetice ale selecţiei microorganismelor.* Editura Nauka, Moscova, p. 62.
10. **AMORY, A., KUNST, F., ANBERT, E., KLIER, A. şi RAPOPORT, G.** *Characterization of the sac Q genes from Bacillus licheniform and Bacillus subtilis.* J. Bacteriol., 169, 1987, pp.324-333.
11. **ANGELL, D. J. R. şi COMER, J. D.** *Response to the Ennvironmental Threat.* N. Z. St. Martins Press, 1990.
12. **ANGHEL, I., POPA, O. ş.a.** *Biologia şi tehnologia drojdiilor.* Vol. 3, Editura Tehnică, Bucureşti, 1993.
13. **ANGUILAR, A.** *FEMS Microbioogy. Reviews*, 18, 1996, pp. 89-92.
14. **ANSON, M. L.** *J. Gen. Physiol.* 22, 1939, p. 79.
15. **ANTONOVA, K. D. şi NICOSKA, T.** *Acta Microbiol.* 28, C.A.116, 9, 1991, pp. 27-33.
16. **ASENJO, J. A.** (ed). *Separation Processes in Biotechnologyi.* Marcel Dekker, New York, 1990.

17. ATKINSON, B. şi MAVITUNA, F. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook.* Stockton Press, New York, 1991.
18. AUNSTRUP, K. *Microorganism as producers of enzymes.* Microbiol. Ind. Aliment., Ann. Congr. Int. 3, Asociation Promot. Ind. Agric. Paris, 1979, pp. 77-96.
19. AUNSTRUP, K. *New developments in the production and use of Bacillus proteases.* Abh. Akad. Wiss. D. DR. Abt. Math. Naturwiss. Tech. (3N. Mikros. Enzymprod), 1981, pp. 447-457.
20. BALANDRIN, A. W., KLOCKE, J. A. *Medicinal, aromatic and industrial materials from plants.* In: „Biotechnologz in Agriculture and Forestry", Medicinal and Aromatic Plants I, Ed. by Y.P.S. Bajaj, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1988, pp. 191-199.
21. BANERJEE, R. *Bioprocess Engineering.* 7, 1992, pp. 369-374.
22. BANU, C. *Biotehnologii în industria alimentară.* Editura Tehnică, Bucureşti, 1987, p. 54.
23. BANU, C. *Biotehnologii în industria alimentară.* Editura Tehnică, Bucureşti, 2000.
24. BARJANSKAIA, E. C. *Selecţia dirijată a mutanţilor de Bacillus subtilis A-30 cu producţie mărită de proteaze alcaline şi analiza lor genetică.* Teză de doctorat, Moscova, VNII Genetika, 1976.
25. BARNEA, M. şi CALCIU, A. (redactor). *Ecologie umană.* Ed. Medicală, Bucureşti, 1979.
26. BARNETT, C. C., BERKA, R. M. şi FOWLER, T. *Cloning and amplification of the gene incoding an extra cellular β-glucosidase from Trichoderma reesei: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates.* Bio/Technology, 9, 1991, pp. 562-567.
27. BAROZEVICI, E. *Supermutagenii.* Editura Nauka, Moscova, 1966, p. 23.
28. BARTON, R. Brevet US 32 699181, Cl(95-66), 1966.
29. BAUMBERG, S., HUNTER, I. şi RHODES, M. *Microbial Products: New Approaches.* Cambridge University Press, Cambridge, 1989.
30. BELOVA L., TENSON T., XIONG L., MCNICHOLAS P. M., MANKIN A. S. *PNAS USA* 98, 2001, pp. 3726-3731.
31. BENEDICK, R. E. *New directions in Safeguarding the Planet.* Cambridge, Harvard Univeritz Press, 1991.
32. BERGMEYER, H. U. *Methods of Enzymatic Analysis.* Vol. VI, 1983.
33. BLONDEAU J. M., DECAROLIS E., METZLER K. L., HANSEN G. T. *Expert Opin. Investig. Drugs* 11, 2002, pp. 189-215.
34. BLOQUEL, R. şi VEILLET-PONCET, L. *Microbiologie-Aliment-Nutrition* 2, 1984, pp. 179-185.
35. BLOW, D. M. Acc. Chem. Res., 9, pp. 145-152, 1976.
36. BODEA, C. *Tratat de biochimie vegetală.* Editura Academiei Române, 1964.
37. BONFIGLIO, G., FURNERI, P. M. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 10, pp. 185-198, 2001.

38. **BOREHSTEIN, S. W.** *Microbiologically influenced Corrosion handbook.* Industrial Press Inc., N. Y., 1994.
39. **BORRISS, R., BAUMLEIN, H. şi HOFEMEISTER, J.** *Expression in Escherichia coli of a cloned β-gluconase gene from Bacillus amyloliquefaciens.* Appl. Microbiol. Biotechnol., 22, 1985, p. 63.
40. **BOURGAUD, F., BOUQUE, V., GONTIER, E., GUCKERT, A.** *Hairy root cultures for the production of secondary metabolites.* AgBiotech News and Information, 9, 1997, pp. 205–208.
41. **BOURGAUD, F., GRAVOT, A., MILESI, S., GONTIER, E.** *Production of plant secondary metabolites: a historical perspective.* Plant Science, 161, 2001, pp. 839-851.
42. **BOUTROUX, L.** *Compt. rend.* 91, 1880, p. 236.
43. **BRAUTASET, T., SEKUROVA, O. N., SLETTA, H., ELLINGSEN, T. E., STRØM, A., VALLA, S.** *Chem. Biol.*, 7, 395-403, 2000.
44. **BRIDSON, E. Y. şi BRECKER, A.** *Design and formulation of microbial culture media.* In: „Methods in Microbiology", Academic Press, London, vol. 3A, 1970, pp. 229-295.
45. **BRILLOUET, J. M.** *A study of pectic polysaccharides in musts from various mature grapes grown in the Pech Rouge experimental vineyards.* Biochimie, 69, 1987, pp. 713-721.
46. **BRISKIN, D. P.** *Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health.* Plant Physiology, 124, 2000, pp. 507–514.
47. **BROCKERHOFF, H.** *Lipolytic enzymes.* In: Advances in Chemistry Series, No. 136, Food Related Enzymes, American Chemical Society, New-York, 1974, pp.131-145.
48. **BRODELIUS, P.** *Industrial applications of immobilized biocatalyst.* In: Adv. Biochem. Eng., vol.10, Springer, pp. 75-129.
49. **BRON, SIERD.** *Plasmids, Molecular Biology Methods for Bacillus.* Edited by C. R. Hsrwood and S. M. Cutting, John Wiley 8, Sons Ltd., 1990.
50. **BROWN, M. R. şi OUGH, C. S.** *A comparison of activity and effects of two commercial pectic enzyme preparations on white grape musts and wines.* Am.J. Enol. Vitic., 32, 1981, pp. 272-276.
51. **BRUICE, T. C. şi BENKOVIC, S. J.** *Bioorg. Mechanism.* 1, 1960, p.178.
52. **BULICH, A. A.** *Producing Pullulanase with Organisms Having a Superior Capacity to Elaborate Pullulanase.* U. K. Patent 1499340, 1978.
53. **BULLOCK, T. D. şi KRISTIANSEN, B.** *Basic Biotechnology.* Academic Press, New York, 1987.
54. **BUNGE, M.** *Ştiinţă şi filosofie.* Ed. Politică, Bucureşti, 1984.
55. *Bv. S.U.A. no. 3622459*, 1970.
56. **CHAMBERLAIN, J. şi TOMLINSON, E.** *Impact of the New Biotechnology on Medical and Pharmaceutical Sciences.* The Pharmaceutical Press, London, 1992.
57. **CHANDER, H., KLOSTERMEYER, H.** *Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig.* C3, 1982, pp. 427-431.

58. **CHANG, S. şi COHEN, S.,N.** *High frequency transformation of Bacillus subtilis protoplasts by plasmid DNA*. M.G.G. 1979, 168, pp.111-115.
59. **CHEN, T. S.** *Biotechnol. Lett.* 13, 1991, pp. 773-778.
60. **CIONGA, E. şi AVRAM, L.** *Medicamente chimioterapice*. Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1978.
61. **CLARK, W. C., KATES, R. W., RICHARDS, J. F., MATHEWS, J. T., şi MEZER, W. B.** *The Earth as Transformed by Human Action*. Cambridge, Cambridge University Press, 1990.
62. **CLARKE, L. E., GIBSON, R. F., SHERWOOD, R. F. şi MINTON, N. P.** *Expression of the Pseudomonas gene coding for carboxypeptidase 62 in Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol., 131, 1985, p. 897.
63. **CLOWES, R. C.** *Experiments in microbiol. genetics*. 1970.
64. **COLSON, C. A., CORNELIS, P. E., DIGNEFFE, C. S., WALON, R. G. P. şi WALON, C.** *Genetically Engineered Microorganisms for Massive Production of Amylolytic Enzymes and Process for Preparing Same*. UK Patent 2069503, 1981.
65. **CROLET, J. L. şi MAGOT, M.** *Corrosion*. NACE International, 1995, p. 188.
66. **CRUEGER, W. şi CRUEGER, A.** *Biotechnology*. W.H. Freeman and Company, Oxford, 1990.
67. **CRUEGER, W. şi CRUEGER, A.** *Biotechnology: A textbook of industrial microbiology*. 2nd ed., T. D. Brock (ed.), Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, 1990.
68. **CRUESS, W. V., QUACCHIA, R. şi ERICSON, K.** *Pectic enzymes in wine making*. Food Technol., Dec, 1955, pp. 601-607.
69. **DAHL, M. K., MSADEK, T., KUNST, F. şi RAPOPORT, G.** *Mutational analysis of the Bacillus subtilis Deg U regulator and its phosphorylation by the Deg S protein kinase*. J. Bacteriol., 173, 1991, pp. 2539-2547.
70. **DALE, B. L.** *Cellulose pretreatment: technology and techniques*. Annual reports on fermentation processes, 8, 1985, pp. 299-323.
71. **DAN, V., IONESCU, A., HÎRTOPEANU, A., TOFAC, C., VASU, S. şi JURCOANE, ŞT.** *Selecţionarea unor tulpini de Aspergillus niger, producătoare de glucozoxidază şi catalază*. Lucrările celui de-al IV-lea Simpozion de Microbiologie Industrială (volum), 1984, pp. 303-307.
72. **DĂNESCU, C.** *Chimia şi tehnologia medicamentelor*. Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1994.
73. **DARVILL, A., McNEIL, M., ALBERSHEIM, P. şi DELMER, D. P.** In: *The Biochemistry of plants* (Tolbert, N. E. ed.), Vol. 1, Academic Press, New York, 1980, pp. 91-162.
74. **DAVIES J.** *Nature*, 9 (19), 1996, pp. 219-220.
75. **DELLAPENNA, D.** *Plant metabolic engineering*. Plant Physiology, 125, 2001, pp. 160–163.

76. **DEMAIN, A. L.** *Secondary Metabolytes. Their Function and Evolution,* 1999, Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 171), pp. 3-23.
77. **DEMAIN, A. L.** *Catabolite regulation in industrial microbiology.* FEMS Symposium No. 13, Academic Press London, 1983, pp. 3-20.
78. **DEMAIN, A. L. şi SOLOMON, N. A.** *Biology of Industrial Microorganisms,* Ed. The Benjamin-Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA, London, 1985.
79. **DEMAIN, A. L. şi SOLOMON, N. A.** (eds). *Biology of Industrial Microorganisms.* Benjamin-Cummings Publishing Co., Menlo Park, CA, 1985.
80. **DEMAIN, A. L. şi SOLOMON, N. A.** *Industrial microbiology.* Sci. Am., 245(3), 1981, pp. 66-75,
81. **DEMAIN, A. L. şi SOLOMON, N. A.** *Manual of industrial microbiology and biotechnology.* American Society for Microbiology, Washington D.C., 1986.
82. **DESMAZEND, M. J.** *Enzymes utilizables en industries alimentaire.* Biofutures, 29, 1985, p. 104.
83. **DEUTCH, A. H., RUSHLOW, K. E. şi SMITH, C. J.** *Analysis of the Escherichia coli pro BA locus by DNA and protein sequencing. Nucleic Acids Res.* 12, 1984, pp. 6337-6355.
84. **DEXTER, S. C.** *Biofouling.* 7, 1994, p. 97.
85. **DIACONU, E. şi NECHIFOR, M.** *Antibiotice β-lactamice.* Ministerul Industriei Chimice şi Petrochimice, Bucureşti, 1988.
86. **DOMRACEVA, A. E.** *Genetika.* 7, 1971, p.12.
87. **DONIŢA, N., CEIANU, I., PURCELEAN, S. şi BELDIE, A.** *Ecologie forestieră.* Ed. Ceres, Bucureşti, 1977.
88. **DORAN, P. M.** *Bioprocess Engineering Principles.* Academic Press, NewYork, 1998.
89. **DUCA, G., SCURLATOV, I., MISITI, A., MACOVEANU, M. şi SURPĂTEANU, M.** *Chimie ecologică.* Ed. Matrixrom, Bucureşti, 1999.
90. **DUCROO, P.** *Ind. Aliment. Agricole,* 99, 1982, p. 6,.
91. **DUCRUET, J., DONG, A. N., CANAL-LLAUBERES, R. M. şi GLORIES, Y.** *Influence des enzymes pectolytiques selectionnees pour l'oenologie sur la qualite et la composition des vins rouges.* Rev. Fr. d'Oenologie, 166, 1997, pp. 16-19.
92. **DUMITRU, I. F. şi IORDĂCHESCU, D.** *Introducere în enzimologie.* Editura Medicală, Bucureşti, 1981, p.144.
93. **DUPUY, P.** *Use of enzymes in food technology,* Tec&Doc Lavoisier, Paris, 1982.
94. **DURAND, G. şi MONSAN, P.** *Les enzymes-Production et utilisations industrielles.* Ed. Gauthier-Villars, Paris, 1982.
95. **DWORSCHACK, R. G. şi NELSON, C. A.** *Production of Glucoamylase.* U.S. Patent 3660 236, 1972.
96. **EASTWOOD, M.** Proc. Kellogg Int. Symp. Diet. Fiber, 1990, pp. 16-29.
97. **EDYVEAN, R. G. J. şi DEXTER, S. C.** *MIC in Marine Industries.* A Practical Manual on Microbiologically Influenced Corrosion, COBRIN, G. (Editor), NACE International, 1993.

98. EHRLICH, H. L. *Geomicrobiology*. N.Y., Dekker, M. Inc., 1996.
99. EIJINSK VINCENT, G. H. *Biochem.* J., 285(2), 1992, pp. 625-628.
100. EIJINSK, G. H. V. *Protein Eng.*, 5, 1992, pp. 421-426.
101. ELLAIAH, P., MURALI CHAND, G., SRINIVASULU, B., PARDASARADHI, S.V., *Indian J Exp Biol.*, 38, 2000, pp. 1134-1137.
102. ENDO, S. *J. Ferment Technol.*, 40, 1962, pp. 346-353.
103. ENNIS, B. M., GUTTIEREZ, N. A. şi MADDOX, I. S. *The acetone-butanol-ethanol fermentation: a current assessment.* Process Biochemistry. 21, 1986, pp. 131-147.
104. EXCOFFIER, G. şi TOUSSAINT, M. R. *Saccharification of steam exploded poplar wood.* Biotechnology and Bioengineering, 38, 1981, pp.1308-1317.
105. FAITH, W. T., NEUBECK, C. E. şi REESE, E. T. *Production and applications of enzymes.* Adv. Biochem. Eng., 1, 1971, p. 77.
106. FAN, L. T., GHARPURAY, M. M. şi LEE, Y. H. *Evaluation of pretreatments for enzymatic conversion of agricultural residues.* Biotechnol and Bioeng. Symp., 11, 1981, pp. 29-45.
107. FARID, M. A., EL DIWANY, A. I. *Acta Biotechnol.* 14, 1994, pp. 67-74.
108. *Farmacopeea Română*, ediția a X-a, Editura Medicală, 1992.
109. FERRARI, E., HENNER, D. J., PEREGO, M. şi HOCK, J. A. *Transcription of Bacillus subtilis subtilisin and expression of subtilisin in sporulation mutants.* J. Bacteriol., 170, 1988, pp. 289-295.
110. FLEMING, H. G. şi GEESEY, G. G. *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems.* Springer-Verlag, N.Y., 1991.
111. FLOR, P. Q. şi HAYASHIDA, S. *Production and characteristics of a row starch-digesting glucoamylase o from a protease-negative, glycosidase-negative Aspergillus awamori var. kawachi mutant.* Appl. Environ. Microbiol, 45, p. 905.
112. FLOREA, O. şi DIMA, R. *Procese de transfer de masă şi utilaje specifice.* Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1984.
113. FLYN, H. E. *Cephalosporins and Penicillins.* Academic Press, New York, 1972.
114. FOGARTY, W. M. şi KELLY, C. T. *Microbial enzymes and Biotechnology.* Applied Science Publishers, London, 1983, pp.1-92.
115. FOGARTY, W. M. şi KELLY, C. T. *Microbial enzymes and Biotechnology.* 2nd ed., Ed. Elsevier Applied Science, London&New York, 1989, pp. 275-294.
116. FOGARTY, W. M. şi KELLY, C. T. *Microbial enzymes and Biotechnology.* Second edition, Ed. Elsevier Applied, Biotechnology Series, 1990, pp. 255-275.
117. FREIFELDER, D. *Microbial genetics.* Jones and Bartlett Publishers, Boston, London, 1989.
118. FROST, G. M. şi MOSS, D. A. *Production of Enzymes by Fermentation.* Cap. 3, 1984, pp.134-143.
119. FROST, G. M. şi MOSS, D. A. *Production of Enzymes by Fermentation.* Edited by John & E. Sturge Limited Selby, North Yorkshire, England, 1985, p. 199.

120. **FROST, G. M. şi MOSS, D. A.** *Production of Enzymes by Fermentation.* In: *Biotechnology*, Vol. 7a. In: „Enzyme Technology" (editor J. F. Kennedy), Verlag Chemie, Weinheim, 1987, pp. 65-212.
121. **GAUDY, A. F. şi GAUDY, E. T.** *Microbiology for Environmental Scientists and Engineers.* McGrow Hill, N.Y., 1980.
122. **GAUR, N. K., DUBNAU, E. şi SMITH, I.** *Characterization of a cloned Bacillus subtilis gene that inhibits sporulation in multiple copies.* J. Bacteriol., 168, 1986, pp. 860-869.
123. **GÂRBAN, Z.** *Noţiuni de biologie moleculară.* Timişoara, 1992, p.138.
124. **GEESEY, G. G.** *Biofilm Formation*, A Practical Manual on Microbiologically Influenced Corrosion, COBRIN, G. (Editor), NACE International, 1993.
125. **GEHLEN, S.** *IFAC Symp. Ser. 8* (Adv. Control Chem. Proceses), 1992, pp. 273-278.
126. **GHEŢIE, V. şi MICUSAN, V.** *Analiza imunochimică.* Editura Academiei, Bucureşti, 1966.
127. **GLASBY, S. J.** *Encyclopedia of Antibiotics.* 2nd ed., John Wiley, New York, 1979.
128. **GLUSZC, P., STARZAK, MICHALSKI, H.** *Acta Biotechnologia.* Vol. 8, no. 2, 1988.
129. **GODFREY, T. şi REICHELT, J.** *Industrial Enzymology. The Application of Enzymes in Industry.* MacMillan, Byfleet, U.K, 1983, p. 2.
130. **GOMA, G. şi BLANC, P.** *Glucides: le possoble et le desirable.* Biofutur, nr.113, 1992, pp. 34-46.
131. **GONG, C. S., CHEN, L. F., FLICKINGER, M. C. şi TSAO, G. T.** *Conversion of hemicellulose carbohidrates.* Advances in Biochemical Engineering, 20, 1981, pp. 93-118.
132. **GRANT, W. D., MWATHA, W. E. şi JONES, B. E.** *FEMS Microbiology Reviews*, 75, 1990, pp. 255-270.
133. **GRECU, I., NEAMTU, M. şi ENESCU, L.** *Implicaţii biologice şi medicale ale chimiei anorganice.* Ed. Junimea, Iaşi, 1982.
134. **GREENFIELD, P. F. şi LAURENCE, R. L.** *J. Food Sci*, 40, 1975, p. 906.
135. **GRIFFIN, P. J. şi FOGARTY, W. M.** *Production of an amylolitic enzyme by Bacillus polymyxe in batch cultures.* J. Appl. Chem. Biotechnol. 23, 1973, p. 301.
136. **GU, J.-D., FORD, T. E., MILTON, B., MITCHELL, R.** *Biodegradation.* 9, 1998, p. 35.
137. **GU, J.-D., FORD, T. E., THORP, K. şi MITCHELL, R.** *Int. Biodeter. Degrad.*, 39, 1996, p. 197.
138. **GU, J.-D., FORD, T. E., MILTON, B. şi MITCHELL, R.** *Corrosion/95.* 202, NACE International, Houston, TX, 1995.
139. **GU, J.-D., YANG, S., WELTON, R., EBERILE, D., MCCARTHY, S. P. şi GROSS, R., A.** *J. Environ. Polym.*, Degrad., 2, 1994, p. 129.
140. *Guide National de Prescription de Médicaments*, Editions du Vidal, 1988, p. 209.

141. GUILLOUX-BENATIER, M., PUECH, B. şi FEUILLAT, M. *Incidence d'une activité glucanasique exogene sur le devenir des macromolecules levuriennes du vin.* Vitis, 38 (3), 1999, pp. 133-137.

142. HAIGHT, K. G. şi GUMP, B. H. *The use of macerating enzymes in grape juice processing.* Am. J. Enol. Vitic., 45 (1), 1994, pp. 113-116.

143. HAMILTON, W. A. *Sulfate Reducing Bacteria and Anaerobic Corrosion.* Ann. Rev., Microbiol., vol.39, 1985, pp. 195-217.

144. HARODA, T., YOKOBAYASHI, K. şi MISAKI, A. *Formation of isoamylase by Pseudomonas.* Appl. Microbiol. 16, 1968, p. 1439.

145. HARWOOD, C. R. şi CUTTING, S. M. *Molecular Biology Methods for Bacillus.* Edited by John Wiley and Sons Ltd., 1990, p. 76.

146. HAYLES, J. şi NURSE, P. *Genetics of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe.* „Annual Revue of Genetics", 20, 1992, pp. 373-402.

147. HERIBAN, V., SKARA, J., STURDIK, E. şi ILAVSKY, J. Chem. Fac. Slovak. Tech. Univ. 812 37 Bratislava, (Czech). Biotechnol. Tech., 1993 (1), 63-8, C.A. vol. 119, 5, 1993.

148. HERSHBERGER, C. L., QEENER, S. W. şi HEGEMAN, G. *Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms.* American Society for Microbiology, Washington D.C., 1989.

149. HESELTINE, C. W. şi WANG, H. L. *Fermented foods.* Chem. Ind., London, 1979, p. 393.

150. HIDETO, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56(3), 1992, pp. 510-511.

151. HIGASHIHARA, M. şi OKADA, S. *Studies on β-amylase of Bacillus megaterium strain No.32.* Agric. Biol. Chem. 38, 1974, p. 1023.

152. HILL, G. A., MACDONALD, D. G. şi LANG, X., *α-Amilase inhibition and inactivation in barley malt during cold starch hydrolysis.* Biotechnology Letters, Vol. 19, No.11, November, 1997, pp. 1139-1141.

153. HIRATA, H., NEGORO, S. şi OSADA, H. *High production of thermostable β-galactosidase of Bacillus stearothermophilus in Bacillus subtilis.* Appl. Environ. Microbiol., 49, 1985, p. 1547.

154. HIROSHI, T. *Agric. Biol. Chem.* 55(12), 1991, pp. 3099-3101.

155. HIROSHI, T. şi MIKIO, T. Bv. 482879, 1992.

156. HITOTSUYANAGI, K., YAMARA, K. şi MARUO, B. *Stepwise introduction of regulatory genes stimulating production of α-amylase into Bacillus subtilis: Construction of an α-amylase extrahyper producing strain.* Agric. Biol. Chem. 43, 1979, p. 2343.

157. HOLLAND, D. R. *Biochem.*, 31(46), 11310 (1992), C.A.117, p. 25.

158. HONJO, M., NAKAYOMA, A., FUKAZAWA, K., KAWAMURA, K., ANDO, K., HORI, M. şi EURUTANI, Y. *A novel Bacillus subtilis gene involved in negative control of sporulation and degradative – enzyme production.* J. Bacteriol., 172, 1990, pp.1783-1790.

159. **HORVECKA, D.** *Przem. Spozyw.* 38, 1984, pp. 27-35, Chem.abstr.105, 3, 23030k, 1986.

160. **HOSTED, T. J., WANG, T. X., ALEXANDER, D. C., HORAN, A. C.** *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27, 2001, pp. 386-392.

161. **HU, WENGIWANG, LIEI.** *Human Ehifon Daxue Ziran Kexue Xuebao*, 15(1), 1992, pp. 64-67.

162. **HUGO, W. B. şi RUSSELL, A. D.** *Pharmaceutical Microbiology*. 5th ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1992.

163. **IGARASHI, K., HATADA Y., HAGIHARA H., SAEKI K., TAKAIWA M., UEMURA T., ARA K., OZAKI K., KAWAI S., KOBAYASHI T. şi ITO S.** *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 9, 1998, pp. 3282-3289.

164. **IGARASHI, K., HATADA Y., IKAWA K., ARAKI H., OZAWA T., KOBAYASHI T., OZAKI K. şi ITO S.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 248, 1998, pp. 372-377.

165. **IKURA, Y. şi HORIKOSHI, K.** *Journal of Fermentation Technology*, 65, 1987, p.707.

166. **INGLE, M. B. şi ERICKSON, R. J.** *Bacterial α-amylase*. Adv. Appl. Microbiol. 24, 1978, p. 257.

167. **IONIŢĂ, A., HORIŢĂ, S. şi JURCOANE, ŞT.** *Studies concerning the Proteinase and Amylase Production in Subnergel Liquid Culture of an Aspergillus oryzae Mutant Strain*. Vol. 3, no. 3, Romanian Biotechnological Letters, 1998, pp. 257- 262.

168. **IORDĂCHESCU, D. şi DUMITRU, I. F.** *Biochimie practică*. Bucureşti, 1980, p.133.

169. **IORDĂCHESCU, D. şi DUMITRU, I. F.** *Biochimie practică*. Bucureşti, 1986.

170. **ISOWA, Y.** Bull. Chem. Soc. Jpn., 50, 1977, pp. 2762-2772 .

171. **ISOWA, Y.** Bull. Chem. Soc. Jpn., 51, 1978, pp. 271-276.

172. **ISOWA, Y.** Bull. Chem. Soc. Jpn., 52, 1979, pp. 796-800.

173. **ITO, S. ş.a.** *Extremophiles*, 2, 1998, pp. 185-190.

174. **IVERSON, W. P.** *Microbial corrosion of iron*. In: Microbial iron metabolism, Academic Press., N.Y., 1974.

175. **IWAI, M. şi TSUJISAKA, Y.** *Agr. Biol. Chem.* 38(6), 1974, pp.1241-1247.

176. **JANSHEKAR, H. şi FIECHTER, A.** *Lignin: biosynthesis, application and biodegradation*. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 27, 1983, pp.119-178.

177. **JIMENEZ, M. A.** Proc. Eur. Pept. Symp., C.A.113, 1990, p. 17.

178. **JONES, D. A. şi AMY, P. S.** *Corrosion*. NACE International, 58, 2002, p. 8,.

179. **JONES, D.A. şi AMY, P. S.** *Ind. Eng. Chem. Res.* 39, 2000, p. 575.

180. **JOYET, P., GUERINEAU, M. şi HESLOT, H.** *Cloning of a thermostable α–amylase gene from Bacillus licheniformis and its expression in Escherichia coli and Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Zett., 21, 1984, p. 353.

181. JUNG, G., WELZEL, K., VENTE, A., GIRRESER, U., BECHTHOLD, A. *Chem. Biol.*, 8, 2001, pp. 569-581.

182. JURCOANE, ŞT. *Biotehnologie generală*. Editura Tehnică, Bucureşti, 2001.

183. JURCOANE, ŞT. *Purificarea şi caracterizarea proteazelor microbiene cu aplicaţii în biotehnologie*. Teză de doctorat. Academia Română, 1995.

184. JURCOANE, ŞT., DIACONU, L. şi KISS, G. B. *Izolarea şi caracterizarea plasmidei din B. subtilis şi E. coli introduse prin transformare în B. subtilis*. Roum. Biotech. Letters, vol.2, No. 3, 1997, pp. 207-216.

185. JURCOANE, ŞT., HORIŢĂ, S. şi IONIŢĂ, A. *Procedeu de obţinere a glucozoxidazei cu o tulpină de Aspergillus niger var. phoenicis*. Brevet nr. 95-02217, Cl. 12 N 9/62, România, 1995.

186. JURCOANE, ŞT., HORIŢĂ, S., IONIŢĂ, A., TCACENCO, L., TEODOR, E. şi PROTOPOPESCU, A. *Production and purification of Glucose Oxydase from Aspergillus niger MIUG 55*. Roum. Biotechnol. Lett., vol. 3, no. 1, 1998, pp. 9-14.

187. JURCOANE, ŞT., IONIŢĂ, A., MOCANU, E., RAIANU, G., GEICU, S., GOMOTÎRCEANU, P. şi GABRIEL, GH. *Procedeu de obţinere a L-lizinei prin fermentaţie*. Brevet nr. 109221, 1994.

188. JURCOANE, ŞT., POPA, O., VAMANU, A., LONIŢĂ, A. şi IONESCU, A. *Curs de biochimia şi biotehnologia obţinerii proteinelor şi enzimelor*. („Proteine", partea I). Tipografia USAMV, Timişoara, 1995.

189. KAMELY, D. şi CHAKRABARTY, A. M. *Biotechnology: Bridging Research and Applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1991.

190. KAPTI, K. şi MICHIO, K. *Microb. Util. Renewable Resourse*, 7, pp. 38-45, 1991, C.A.117, 9.

191. KASAI, N. *Agric. Biol. Chem.*, 48, 6, 1984.

192. KATKOCIN, D. M., WORD, N. S. şi YANG, S. S. *A Novel Thermostable Glucoamylase and Method for its Production*. U.K. Patent 2145 094, 1985.

193. KATSUMI, T. *Biotechnol. Biochem.* 56(2), 1992, pp. 246-250.

194. KEAY, L. şi WILDI, S. *Biotechnol. and Bioeng.* 12, 1970, pp. 179-912.

195. KELLY, C. T. *Proc.Biochem.*, 11, 6, 1976, p. 3.

196. KELLY, C. T., McTIGUE, M. A., DOYLE, E. M. şi FOGARTY, W. M. *Journal of Industrial Microbiology*, 15, 1995, pp. 446-448.

197. KELLY, C. T., O'REILLY, F. O. şi FOGARTY, W. M. *FEMS Microbiology Letters*, 20, 1983, pp. 55-59.

198. Kertesz, Z. I. *The Pectic Substance*. Iterscience Publisher, Inc. New-York, Basel, 1987.

199. KERTESZ, Z. I. *The pectic substances*. Intersci. Pub. INC NY, LTD., London, 1951.

200. KIDBY, D. K. şi DAVIES, R. *Biochim Biophys*. Acta, 1970, pp. 202-261.

201. KIKOMON CORP. Bv. Japonia nr. 60.126.082/1985, Chem. Abstr., 103, 159121g, 1985.

202. KIM, C. H., CHOI, H. I. şi LEE, D.-S. *Journal of Industrial Microbiology*, 57, 1993, pp.1632-1637.

203. **KLAPPER, B. F. şi JAMESON, D. M.** *Biochem. and Biophis.* Acta, 304, 1973, p. 505.
204. **KLEGERMAN, M. E. şi GROVES, M. J.** *Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Essentials.* Interpharm Press Inc., Buffalo Grove, Illinois, 1992.
205. **KOISHI, M.** Jpn. Kokai Tokkyo Koho Bv. nr. 89281085, 1989.
206. **KOLEVA, A. şi IVANOVA, T.** 37(3), 1990, pp. 159-169.
207. **KOMORI, AKYOSHI; NISHII, YUZURU şi MAESATO.** Kensho Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 60 217 897(85 217 897) C1 C 12 P 7/56) 1984, C.A. vol. 104, No 9, 1986.
208. **KORASIC, N., ZAJIC, J. E., ABOUE, G., JACK, T. şi GERSON, D.** *Biotechnol. Bioeng.* 21, 1979, pp.1133-1149.
209. **KRAWIEC, S. şi RILEY, M.** *Organization of bacterial chromosome.* Microbiological Reviews, 54, 1990, pp. 502-589.
210. **KREIS, W., REINHARD, E.** *The production of secondary metabolites by plant cells cultivated in bioreactors.* Planta Medica, 55, 1989, pp. 409–416.
211. **KUDO, T., OHKOSHI, A. şi HORIKOSHI, K.** *Molecular cloning and expression of a xylanase gene of alkalophilic Aeromonas sp. No. 212 in Escherichia coli.* J. Gen. Microbiol., 131, 1985, p. 2825.
212. **KULP, K.** *Invertases; in Enzymes in food processing.* Ed. By Reed, G., Academic Press, London, 1975, pp. 86-92.
213. **KUTCHAN, T. M.** *Ecological arsenal and development dispatcher. The paradigm of secondary metabolism.* Plant Physiology, 125, 2001, pp. 58–60.
214. **LAEMMLI, U. K.** *Nature.* 227, 1970, pp. 680-685.
215. **LAMAR, R. T.** *The role of fungal lignin-degradation enzymes in xenobiotic degradation.* Current opinion of Biotechnology, 3, 1992, pp. 261-266.
216. **LAMBERT, P. W.** *Industrial enzyme production and recovery from filamentous fungi.* Vol. 4, „Fungal technology" (J. E. Smith, D. R. Berry, and B. Kristiansen), Edward Arnold, London, 1983, pp. 210-237.
217. **LAO,C., TAMAMES, E. L., LAMUELA-RAVENTOS, R. M., BUXADERAS, S. şi DELA TORRE-BORONAT, M. C.** *Pectic enzyme treatment effects on quality of white grape musts and wines.* J. Food Sci., 62, 1997, pp. 1142-1144.
218. **LAPAGE, S. P., SHELTON, J. E., MITCHELL, T. G. şi MACKENZIE, A. R.** *Culture collections and the preservation of bacterie.* In: *Methods in Microbiology,* Academic Press, London, 3A, 1970, pp.135-228.
219. **LARPENT, J. P.** Les ferment microbiens dans les industries agroalimentaire. Ed. Tec&Doc, Paris, 1993.
220. **LASATER, G. D. şi SMITH, M. B.** *High Potency Glucoamylase and alpha Amylase Enzyme System by cultivation of Aspergillus niger.* U.K. Patent, 2016, 1979, p. 476.
221. **LEETHAM, G. F. şi HIMMEL, M. E.** (eds.). *Enzymes in Biomass Conversion.* American Chemical Society, Washinton D.C., 1991.
222. **LEHNINGER, A. L.** *Biochimie.* 1, Editura Tehnică, Bucureşti, 1987, p. 214.

223. **LERUSALINSKII, N. D.** *Bazele fiziologiei microbilor.* Editura Nauka, Moscova, 1963, p.121.

224. **LEWIN, B.** *Genes.* Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press, 1997.

225. **LIEBL, W., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. H.** *Transfer of Brevibacterium divaricatum DSM 202997^T, Brevibacterium flavum DSM 20412 & DSM 1412 & Corynebacterium lilium DSM 20137^T, to Corynebacterium glutamicum & their distinction by rRNA gene restriction patterns.* Int. J. Syst. Bacteriol., Vol. 41, 1999, pp. 255-260.

226. **LIPMAN, D. J. şi PEARSON, W. R.** *Rapid and sensitive protein similarity searches.* Science, 227, 1985, pp.1435-1441.

227. **LITTLE, B. J., WAGNER, P. şi MANSFELD, F.** *An overview of Microbiologically induced Corrosion.* Electrochim. Acta 37, 1992.

228. **LITTLE, B. J., WAGNER, P. A., HART, K. R., RAY, R. I., LAVOIE, D. M., NEALSON, K. şi AGUILAR, C.** *Corrosion.* NACE International, 215, 1997.

229. **LONCLE, D.** *Génie enzymatique*, Ed. Douin, 1996.

230. **LORENZ, M. G. şi WACKERNAGEL, W.** *Bacterial gene transfer by Natural Genetic Transformation.* In: „Environment Microbiological Reviews", 58, 3, 1994, pp. 563-602.

231. **LOWE, J.** *Unfixed Cryostat or cold Formal Calcium Fixed/Gum Sucrose treated sections on Jejunal Biopsy.* Ed. Nottingham Med. School, Division of Histopathology, 1997.

232. **LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, J. N., FARR, A. L. şi RANDALL, R. P.** J. Biol. Clen. 193, 1951, p. 265.

233. **LUNGU, TR., ŞUTEU, I. COVALIU, I. şi FILIPESCU, C.** *Biologia şi ecologia animalelor.* Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1981.

234. **MAGEE, R. J. şi KOSARIC, N.** *Bioconversion of hemicellulotics.* Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 38, 1985, pp.1-52.

235. **MALIK, M.** Pak. J. Sci. Ind. Res. 34(2) 1991, pp. 91-94.

236. **MANDELS, M.** *Cellulases.* Annual Reports on Fermentation Processes. 5, 1981, pp. 35-78.

237. **MANJON, A., IBORRA, J. L., ROMERO, C. şi CANOVAS, M.** *Properties of pectinesterases and endo-D-PGase coimmobilized in a porous glass support.* App. Biochem. Bioteh., 37, 1992, p. 19.

238. **MANTOVANI GIORGIO şi colab.** Eur. Pat. Appl. EP 517, 343 (C1 C 12, P 7/56) 1992, C.A. vol. 118, 11, 1993.

239. **MARA, D. D. şi WILLIAMS, J. D. A.** *Corrosion of mild steel by nitrate reducing bacteria.* Chem. Ind., 21, 1971.

240. **MARCHAL, R., REPARS, M., POURQUIE, J., FAYOLLE, F. I. şi VANDECASTEELE, J. P.** *Large scale enzymatic hydrolysis of agricultural biomass.* Part. 2: „Conversion into acetone-butanol". Bioresource Technology, 42, 1992, pp. 205-217.

241. **MARKKANEN, P. H. şi BOILEY, M. J.** *Simultaneous production of α-amylase β-glucanase and proteolytic enzymes' by Bacillus subtilis.* J. Appl. Chem. Biotechnol, 1974.
242. **MARSHALL, K. C.** *Interfaces in Microbial Ecology.* Harvard University Press, Cambridge, MA, 1976.
243. **MASLOWSKI, B.** (Akademia Exonomicza, Wroclaw) Pol. PL 144 390 (cl C 12 P 7/56), 31 May, 1988, Appl. 251 344, 28 Dec. 1984, C.A., vol. 111, 9, 1989.
244. **MASOACHI, Y.** Nippon Shokuhin Kogyo Cekkaishi, 38(10), 1991, pp. 954-961.
245. **MATSUBARA, H.** Arch. Biochem. Biophys., 115, 1966, p. 324.
246. **MATSUBARA, H.** Biochem Biphys. Res. Commun., 14, 1966, p. 719.
247. **MATSUBARA, H.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 21, 1965, p. 242.
248. **MATSUBARA, H.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 24, 1966, p. 427.
249. **MATSUBARA, H.** J. Biol. Chem., 243, 1968, p. 1732.
250. **MATSUBARA, H.** *Molecular Mechanism of Temperature Adaptation.* 1967, p. 283.
251. **MATSUBARA, H.** *The Enzymes.* Academic Press New York, 3rd ed., 1991, p. 765.
252. **MATSUBARA, H. şi FEDER, J.** *The Enzymes.* Academic Press, New York, 3, 1971, p. 721.
253. **MATSULEVICI, N. A. şi CESNIKOV, YU G.** J. Prikl. Him., 1989, 62(9), 1950-1954.
254. **MAY, S. V.** *Biocatalysis in the 1990s: A perspective*, Enzime Microb. Technol., 14, 1989, pp. 80-84.
255. **MCBETH, H. şi COLLINSON, P.** *Human population dynamics.* Cambridge University Press, UK, 2002.
256. **MCCAULEY, R.** *Corrosion of ceramics.* N.Y., Dekker, M. Inc., 1995.
257. **MCTIGUE, M. A., KELLY, C. T., DOYLE, E. M. şi FOGARTY W. M.** *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 1995, pp. 570-573.
258. **MCTIGUE, M. A., KELLY, C. T., FOGARTY, W. M. şi DOYLE, E. M.** *Biotechnology Letters*, 6, 1994, pp. 569-574.
259. **MEERS, J. L.** *The regulation of α-amylase production in Bacillus licheniformis.* Antonie van Leenwenhock, 38, 1972, p. 585.
260. **MENCINICOPSCHI, GH. şi BRĂGĂREA, ŞT.** *Bioingineria preparatelor enzimatice microbiene.* Editura Didactică şi Pedagogică.
261. *Merck-Catalogue Appl.* Copyright, Merck Darmstadt.
262. **MICHIHIKO, S.** *Schokuhiu Sogo Kenkyusho Knkin Hokoku*, 55, 1991, pp. 49-51.
263. **MIELENZ, J. R. şi MICKEL, S.** *A process for cloning the gene coding for a thermostable α–amylase into Escherichia coli and Bacillus subtilis.* Eur. Patent, 57, 1982, p. 976.
264. **MIKI, K.** Jpn. Kokai Tokkyo Koho Jp. 9288963, 1992.
265. **MIKI, K., HIROHITO, M.** Jpn. Kokei. Tokkyo Koho Bv. 91161447, 1989.
266. **MILAZZO, G. (editor).** *Bilogical Aspects of Electrochemistry.* Proc. Of 1st International Sympozium, Ed. Birkhauser verlag Basel, 1971.
267. **MING, CHU., LEECHAMPION şi LITSUSHUN,** *Enzyme Microbiol. Technol.*, 14(9) 1992, pp.755-761.

268. MOHAN, G. şi ARDELEAN, A. *Ecologie şi protecţia mediului.* Ed. Scaiul, Bucureşti, 1993.
269. MOLLIARD, N. *Compt. rend.* 174, 1928, p. 881.
270. MONSON, P. Patent S.U.A. 3557002, 1971.
271. MONSON, P. şi COMBES, D. *Application of immobilized invertase to continuous hydrolysis of concentrated sucrose solutions.* Biotechnol. Bioeng., 26, 1984, pp. 347-351.
272. MONSON, P. şi COMBES, D. *Biotech.* 84, 1, 1984, p. 385.
273. MONSON, P. şi COMBES, D. *Enz. Eng.*, 7, 1984, p. 379.
274. MONTGOMERY, C. *Environmental Geology.* Mc. Grow Hill, N.Y. 2000.
275. MORBACH, S., SAHM şi EGGELING, L. *Use of feedback-resistant threonine dehydratases of Corynebacterium glutamicum to increase carbon flux towards L-isoleucin.* App. Environmental Microbiology, Vol.6, No.12, 1985.
276. MORIHARA, K. *Adv. Enzymology.* 41, 1974, pp. 179-243.
277. MORIHARA, S. *Agric. Biol. Chem.* 55, 1991, pp. 2099-2103.
278. MORIKAWA, K. *Biochem.Biophys.*Res.Commun., 84, 1978, pp. 95-101.
279. MOŢA, C., ROŞU, A., CÂMPEANU GH. *Compuşi bioactivi de origine vegetală. Abordări biotehnologice.* Progrese în Biotehnologie, 2, Ars Docendi, pp. 99–126, 2002.
280. MUKAI, K., KAWATA, M. şi TANAKA, T. *Isolation and phosphorylation of the Bacillus subtilis deg S and deg U gene products.* J. Biol. Chem., 265, 1990, pp.824-834.
281. MUKAI, K., KAWATA-MUKAI, M. şi TANAKA, T. *Stabilization of phosphorylated Bacillus subtilis Deg U by Deg R.* J. Bacteriol., 174, 1992, pp. 7954-7962.
282. MURPHY, M. P. *Ce este viaţa? Următorii 50 de ani.* Ed. Tehnică, Bucureşti, 1999.
283. NAGAMI, Y. şi TANAKA, T. *Molecular cloning and nucleotide sequence of a DNA fragment from Bacillus natto that enhances production of extracellular proteases and levansucrase in Bacillus subtilis.* J. Bacteriol. 166, 1986, pp. 20-28.
284. NAKADAI, T. şi NASUNO, S. *Agric. Biol. Chem.*, 37, 1973, p. 2703.
285. NAKAGAWA, H., YAMAGAWA, Y. şi TAKEHANA, H. *Studies on the pectolytic enzyme.* Part 4. Agr. Biol. Chem., 34, 1970, p. 998.
286. NAKASHIMA, T., FUKUDA, H., NOJIMA, Y. şi NAGAI, S. *J. Ferment. Bioeng.* 68(1), 1989, pp.19-24.
287. NAPIER, E. J. *β-Amylases.* U.S. Patent, 4011, 1977, p. 136.
288. NASUNO, S. *J. of Gen. Microb.*, 70, 1972, p. 29.
289. NATIVEL, F., POURQUIE, J., BALLERINI, D., VANDECASTEELE, J. P. şi RENAULT, PH. *The biotechnology facilities at Soustons for biomass conversion.* International Journal of Solar Energy, 11, 1992, pp.219-239.
290. NEAMŢU, G. *Biochimie vegetală.* Editura Ceres, Bucureşti, 1981.
291. NEGWER, M. *Organic Chemical Drugs and their Synonims.* Vol 1-3, 6th ed., Verlag Chemie, Weinheim, 1987.
292. NENIŢESCU, C. D. *Chimie organică.* Vol. II, ediţia a VI-a, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1968.

293. **NIELSEN, S. C., DIERS, I. V., OUTTRUP, H. şi NORMAN, B. E.** *Debranching Enzyme Product Preparation and Use Thereof.* U.K. Patent 2097405, 1982.

294. **NOMURA ş.a.** *Construction of a transducing phage ρ11 containing α-amylase structural gene of Bacillus subtilis.* Agric. Biol. Chem. 43, 1979, p. 2637.

295. **NORIMASA, T., TAKESHI, H.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(11), 2003, pp. 6412-6417.

296. **NORMAN, B. E.** *New development in starch syrup technology.* Applied Science Publishers, London, 1981, pp 15-50.

297. **Novo Industrials.** *Enzymes Division*, Denmark, prospect de prezentare.

298. **NUNEZ, L. E., MENDEZ, C., BRANA, A. F., BLANCO, G., SALAS, J. A.** *Chem. Biol.*, 10(4), 2003, pp. 301-311.

299. **OBARA, HITOMI** (Schimadzu Corp) Jpn. Kokai Tokkyo Koho, J.P. 0191,788 (8991788) C.A. 111 (9)/1989.

300. **OGURA, M., KAWATA, M., ITAYA, M., TAKIO, K. şi TANAKA, T.** *Multiple copies of the pro B Gene enhance deg S – Dependent extracellular protease Production in B. subtilis.* Journal of Bacteriology, sept.1994, pp. 5673-5680.

301. **OKADA, J., SHIHOGAKI, H., MURATA, K. şi KIMURA, A.** *Cloning of the gene responsible for the extracellular proteolytic activities of Bacillus licheniformis.* Appl. Microbiol. Biotechnol., 20, 1984, p. 406.

302. **OLSSON, A., HAGSTROM, T., NILSSON, B, UHLEN, N. şi GATENBECK, S.** *Cloning of Bacillus sphaerious penicillin V amidase gene and its expression in Escherichia coli and Bacillus subtilis.* Appl. Environ. Microbiol., 49, 1985, p. 1084.

303. **ONISCU, C.** *Chimia şi tehnologia medicamentelor.* Editura Tehnică, Bucureşti, 1988.

304. **ONISCU, C.** *Tehnologia produselor de biosinteză.* Editura Tehnică, Bucureşti, 1978.

305. **OREN, A.** *A thermophilie amyloglucosidase from Halobacterium sodomense, a halophilic bacterium from the Dead Sea.* Curr. Microbiol. 8, 1983, p. 225.

306. **OTA, Y., GOMI, K., KATO, S., SUGIURA, T. şi MINODA, Y.** *Agr. Biol. Chem.* 46(12), 1982, pp. 2885-2993.

307. **OUTTRUP, H. şi NORMAN, B. E.** *Properties and application of a thermostable maltogenic amylase produced by a strain of Bacillus modified by recombinant DNA techniques.* Stärke, 36, 1984, p. 405.

308. **OUTTRUP, H., DIDERICHSEN, B. K. şi CHRISTIANSEN, L.** *Maltogenic Amylase Enzyme Product, Preparation and Use Thereof.* Eur. Patent Appl. 120693, 1984.

309. **PAGE, M. I.** (ed.). *The Chemistry of β-Lactams.* Chapman & Hall, New York, 1992.

310. **PAL, N., DAS, S. şi KUNDU, A. K.** *J. Ferment. Technol.* 56(6), 1978, pp. 593-598.

311. **PANBANGRED, W., FUKUSAKI, E., EPIFANIO, E. C., SHINHYO, A. şi OKADA, H.** *Expression of a xylanase gene of Bacillus pumilus in Escherichia coli and Bacillus subtilis.* Appl. Microbiol. Biotechnol., 22, 1985, p. 259.

312. **PANG, A. S. H., NATHOO, S. şi WONG, S. L.** *Cloning and characterization of a pair of novel genes that regulate production of extracellular enzymes in Bacillus subtilis.* J. Bacteriol., 173, 1991, pp. 46-54.

313. **PARADIES, H. H.** *Bioextraction and Biodeterioration of Metals.* The Biology of World Resources, Series I, Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 1995.

314. **PARISI, F.** *Advances in lignocellulosics hydrolysis and the utilization of the hydrolizates.* Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 32, 1989, pp. 61-93.

315. **PARKINSON, J. S.** *Signal transduction shemes of bacteria.* Cell, 73, 1993, pp. 857-871.

316. **PASHINIA, E. I.** *Maslo-z hirovaja promyshlennost*, Moscova, 2, 1984, pp. 19-20.

317. **PELE, M.** *Studii privind obținerea în faza pilot și modelarea matematică a procesului de biosinteză discontinuu a enzimelor pectolitice.* Teza doct., 1996.

318. **PELE, M., POPESCU, N. R., MOHOREA, A. R. și STĂNESCU, C.** *Procedeu pentru obținerea unui preparat enzimatic pectolotic pe mediu semisolid.* Brevet de invenție Ro. 100 893 (Cl C12)1991, 1998.

319. **PEREGO, M. și HOCK, J. A.** *Sequence analysis and regulation of the hpr locus, a regulatorz gene for protease production and sporulation in Bacillus subtilis.* J.Bacteriol., 170, 1988, pp.2560-2567.

320. **PERLMAN, D.** (ed.). *Structure-activity Relationships among the Semisynthetic Antibiotics.* Academic Press, New York, 1977.

321. **PERSSON, I., TJERNEDID, F. și HAHN-HAGERDAL, B.** *Fungal cellulolytic enzyme production: a review.* Process Biochemistry, 26, 1991, pp.65-74.

322. **PHAFF, H. J.** *Industrial microorganisms.* Sci. Am., 245(3), 1981, pp. 76-89.

323. **PINCHES, A., LOUW, M .E. și WATSON, T. G.** *Growth plasmid stability and α–amylase production in batch fermentations using recombinants Bacillus subtilis strain.* Biotechnol. Lett., 7, 1985, p. 621.

324. **POP, I.** *Biogeografie ecologică.* Ed. Dacia, Cluj Napoca, 1977.

325. **POPESCU, H.** *Medicamente de biosinteză și extracție.* Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1980.

326. **PORA, E. A. (redactor).** *Probleme actuale de biologie.* Vol. III, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1978.

327. **POURBAIX, M.** *Atlas of Electrochemical Equilibria Aqueous solutions.* NACE International, 1974.

328. **POURQUIE, J. și VANDECASTEELE, J. P.** *Conversion de la biomasse lignocellulosique opar hydrolyse enzimatique et fermentation.* In: Rene Scriban, Biotechnologie, 4^{éme} édition, 1993.

329. **POURQUIE, J., WARZIWODA, M., CHEVRON, F., THERY, M., LONGCHAMP, D. și VANDECASTEELE, J. P.** *Scale up of cellulases production and utilization.* In: Aubert J. P., Beguin P. and Millet J. Ed. FEMS, Symposium no. 43, „Biochemistry and genetics of cellulose degradation". Academic Press Ltd. London, 1988, pp. 71-86.

330. **POWERS, R. A., BLASQUEZ, J.** *Protein Science,* 8(11), 1999, pp. 2330-2337.

331. **PRAVE, P., FAUST, U., SITTING, W. și SUKATSCH, D. A.** *Biotechnology.* A students Guide, VCH- Publisher, 1978.

332. **PROGOGINE, I. şi STENGERS, I.** *Noua Alianţă.* Metamorfoza Ştiinţei, Ed. Politică, Bucureşti, 1984.

333. **RATLEDGE, C.** *Fermentation substrates* in: *Annual Reports on Fermentation Processes.* Academic Press, New York, I, 1977, pp. 49-71.

334. **RAUL, M. şi MUNTEANU, O.** *Reactoare chimice.* Litografia Institutului Politehnic Bucureşti, 1983.

335. **REHM, M. J. şi REED, G.** *Biotechnology A. Comprehensive Treatise.* Vol. 8, VCH, Weinheim, 1981–1987.

336. **RHODES, M. J. C., ROBINS, R. J., HAMIL, J. D., PARR, A. J., HILTON, M. G., WALTON, N. J.** *Properties of transformed root cultures.* In: „Secondary Products from Plant Tissue Culture", Ed. by B. V. Carlwood & M. J. C. Rhodes, Oxford University Press, England, 1990, pp. 201-225.

337. **RINTU, P.** *Biotechnol. Liett.*,14(4), 1992, pp. 301-304.

338. **RIVIERE, J.** *Les applications industrielles de la microbiologie.* Ed. Masson&Cie, Paris, 1975.

339. **ROBYT, J. şi FRENCH, D.** *Purification and action pattern of an amylase from Bacillus polymyxa.* Arch. Biochem. Biophys., 1964, pp.104-338.

340. **ROMBOUTS, F. M. şi PILNIK, W.** *Process Biochem.*, 1978, p. 13.

341. **ROPARS, M., MARCHAL, R., POURQUIE, J. şi VANDECASTEELE, J. P.** *Large scale enzymatic hydrolysis of agricultural biomass.* Part 1: „Pretreatment procedures". Bioresource Technology, 42, pp.197-204.

342. **ROSE, A. H.** *Microbial Enzymes and Bioconversion.* Acad. Press London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, p. 51.

343. **ROSE, L. H.** *Chem. Engineering.* 5, 1974, p. 13.

344. **ROŞEANU ANCA, ŞERBAN, M.** *Biochimia glicozidazelor,* „Studii şi cercetări de biochimie", vol. 30, nr. 2, 1987, pp. 205-214.

345. **ROŞEANU ANCA.** *Obţinerea şi caracterizarea biochimică a unui preparat enzimatic glicozidazic cu utilizare în terapia de substituţie.* Teză de doctorat, 1993.

346. **ROŞU, A.** *Culturi de calus şi de celule în suspensie.* În: „Elemente de biotehnologii vegetale. Aplicaţii în ameliorare", Editura Ametist, Bucureşti, 1999, pp. 71-88.

347. **ROŞU, A.** *In vitro morphogenesis in apple mesophyll explants under the effect of 5-azacytidine.* Lucrări Stiinţifice, Seria F, Vol. III, 1998, pp. 7-12.

348. **SACCO, M., MILLET, J. şi AUBERT, J. P.** *Cloning and expression in Saccharomyces cerevisiae of a cellulase gene from Clostridium thermocellum.* Ann. Microbiol. (Paris), 1984, 135A, p. 485.

349. **SAITO, H. şi MIURA, K.** *Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment.* Biochimic and Biphysic Acta, 72, 1963, pp. 618-629.

350. **SAITO, N. şi YAMAMOTO, K.** *Regulatory factors affecting α-amylase production in Bacillus licheniformis.* J. Bacteriol.121, 1975, p. 848.

351. **SALVATORE, T.** *Biochemistry.* 30(1), 1991, pp. 97-106.

352. SALZER, P. şi HAGER, A. *Characterization of wall-bound invertase isoforms of Picea abies cells and regulation by ectomycorrhizal fungi.* Physiol. Plant. 88, 1993, pp. 52-59.

353. SANTOS, J. A. L., CABRAL, J. M. S. şi COONEY, C. L. *Bioprocess Eng.* 7 (5), 1992, pp. 205-211, Chem. Abstr. 116, 1992, 192524g.

354. SARDINAS, J. L. *Renin enzyme of Endothia parasitica.* Appl. Microbiol., 16, 1968, p. 248.

355. SĂSĂRMAN, E. *Obţinerea şi caracterizarea mutantelor producătoare de L-lizină.* Teză de doctorat, 1980.

356. SĂSĂRMAN, E., CONDUR, M., RĂDULESCU, C., NIŢELEA, I., VOCIU, M., MINCULESCU, A. şi MARICA, E. *Mutant de Brevibacterium lactofermentum şi procedee de obţinere a acestuia.* Brevet OSIM 65097, 1975.

357. SĂSĂRMAN, E. şi JURCOANE, ŞT. *Microbiologie industrială.* Editura Mirton, Timişoara, 2000.

358. SĂSĂRMAN, E., SÂRBU, C., MOCANU, E., DOBROVOLSKI, D. *Fuziunea protoplaştilor bacterieni şi analiza genetică a recombinanţilor.* Lucrările celui de-al V-lea Simpozion de Microbiologie Industrială şi Biotehnologie-Iaşi, 1986.

359. SASHIHARA, N., KUDO, T. şi HORIKOSHI, K. *Molecular cloning and expression of cellulase genes of alkalophilic Bacillus sp. strain N-4 in Escherichia coli.* J. Bacteriol., 158, 1984, p. 503.

360. SAWAGUKI, K. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, Bv. nr. 9143079, 1991.

361. SCHILL, W. B. şi SCHUMACHER, G. F. B. *Anal. Biochem.*, 46, 1978, p. 502.

362. SCHMIDT, R. D. *Advanc. Biochem. Eng.*, 12, 1979, p. 41.

363. SCHMITT, G. *Corrosion.* NACE International, 47, 1991, p. 285.

364. SHRODINGER, E. *Ce este viaţa?* Ed. Politică, Bucureşti, 1980.

365. SCRAGG, A. (ed.). *Biotechnology for Engineers.* Halsted Press, New York, 1998.

366. SCRIBAN, R. *Biotechnology.* 4ème edition, Ed. Technique & Documentation-Lavoisier, Paris, 1993.

367. SCRIBAN, R. *Biotechnology.* Ed. Technique & Documentation-Lavoisier, Paris, 1984.

368. SHAHANI, K. M. *Lipases and Esterases.* In: Enzimes in Food Procesing (editor G. R. Reed), 2nd Ed., Academic Press, New-York, 1975, pp.181-217.

369. SHIGENORI, U. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 1987, pp. 876-886.

370. SHIRU, J. şi SHUCIN, Z. *Shipin Yu Fajiao Gongye*, 5, 17, 1991, pp. 28-31.

371. SIKYTA, B. şi KYSLIK, P. *Selection of Escherichia coli with increased endoenzyme synthesis in continuous culture. Advances in Biotechnology*, vol.1, 1980, pp. 215-220.

372. SIMIONOVICI, M., CÂRSTEA, AL. şi VLĂDESCU, C. *Cercetarea farmacologică şi prospectarea medicamentului.* Editura Medicală, Bucureşti, 1983.

373. SIMITI, I. şi SCHWARTZ, I. *Structură chimică-activitate biologică*, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1974.

374. SOLEV, V. *Microbios.*, 66, 1991, pp. 157-171. Chem. Abstr. 115, p. 15.

375. **SOMOGYI, M.** *Notes on sugar determination.* J. Biol. Chem., 159, 1952, pp. 19-23.
376. **SOOG L, H.** *Misaengemul hakhoecki.* 29(3), 1991, pp. 167-171.
377. **STANISICH, V. A.** *Identification and analysis of plasmids at the genetic level.* In: *Methods in Microbiology Plasmid Technology*, Academic Press, London, 17, 1984, pp. 5-32.
378. **STANSBURY, E. E. şi BUCHANAN, R. A.** *Fundamentals of electrochemical corrosion.* ASM International, 2000.
379. **STOICA ILEANA, VASSU TATIANA DIMOV, SĂSĂRMAN ELENA.** *Biologia şi taxonomia moleculară a microorganismelor.* Colecţia de culturi microbiene, Ed. Arwin Press, 2002.
380. **STOICA, M.** *Lucrările Institutului de Cercetări şi Proiectări Alimentare.* Vol. I, 1972, p.199.
381. **STREYER, L.** *Biochemistry.* Standford Univ. New York, 1988.
382. **STROESCU, V.** *Bazele farmacologice ale practicii medicale,* 2000, Editura medicală, Bucureşti.
383. **STROHL, W. R, DEKKER, M.** (Eds) *Biotechnology of Antibiotics*, 1997, 2nd ed, New York.
384. **SWAROOPA RANI, A.** *Chem. Biochem. Eng., Q,* 17(2), 2003, pp. 119-122.
385. **STRONING, A.** *Proteins Sequences Data Anal.* 4(6), 1991, pp. 355-361.
386. **SUZUKI, Y. şi IMAI, T.** *Bacillus stearothermophilus KP 1064 pullulan hydrolase. Its assignment to a unique type of maltogenic α-amylase but to neither pullulanase nor isopullulanase.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 21, 1985, p. 20.
387. **SVENSSON, B., PEDERSEN, T. G., SVENDSEN, I., SAKAI, T. şi OTTESEN, M.** *Characterisation of two forms of glucoamylase from Aspergillus niger.* Carlsberg Res.Commun. 47, 1982, p. 55.
388. **ŞERBAN, M. şi ROŞOIU, N.** *Substanţe biologic active din organisme marine.* Editura Academiei Române, Bucureşti, 1992.
389. **TABATA, M.** *Recent advances in the production of medicine substances by plant cell cultures.* In: Plant Applications, Ed.by W. Barz, E. Reinhard, M.H. Zenk, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977, pp. 3-13.
390. **TALLY, F. P., DEBRUIN, M. F.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 46, 2000, pp. 523-526.
391. **TAKASAKY, Y.** *Studies on amylases from Bacillus effective for production of maltose. Productions and utilisations of β-amylase and pullulanase from Bacillus cereus var. mycoides.* Agric. Biol. Chem. 40, 1976, p. 1515.
392. **TAKEMOTO, H.** (Toyo Soda Mfg.Co.), Bv. Japonia nr. 61.12384/1986, Chem. Abstr., 104(21),184875j, 1986.
393. **TAKIZAWA, N. şi HUROOKA, Y.** *Cloning of the pullulanase gene and orerproduction of pullulanase in Escherichia coli and Klebsiella aerogenes.* Appl.Environ. Microbiol. 49, 1985, p. 294.
394. **TAMURI, M., YOKOSUKA, M., KANNO, M. şi ISHI, Y.** *Heat and Acid-Stable α-Amylase Enzyme and Processes for Producing the Same.* U.S. Patent 4284722, 1981.

395. **TANAKA TAND SAKAGUCHI.** *Construction of Recombinant Plasmid.* 1978.

396. **TANAKA, T., KAWATA, M., NAGAMI, Y. şi UCHIYAMA, H.** *Prt R enhances the mRNA level of the Bacillus subtilis extracellular proleases.* J.Bacteriol., 169, 1987, pp. 3044-3050.

397. **TATNALL, R. E.** *Introduction.* A Practical Manual on Microbiologically Influenced Corrosion, COBRIN, G. (Editor), NACE International, 1993.

398. **TATNALL, R. E. şi POPE, D. H.** *Identification of MIC.* A Practical Manual on Microbiologically Influenced Corrosion, COBRIN, G. (Editor), NACE International, 1993.

399. **TATSUKI, OKA.** *J. Biochem.* 88, 1980, pp. 807-813.

400. **TEERI, T. T., REINIKAINEN, T., ROUHONEN, L., JONES, T. A. şi KNOWLES J. C. K.** *Domain function in Trichoderma reesei cellobiohydrolases.* Journal of Biotechnology, 24, 1992, pp.169-176.

401. **TINGZHOU, Z. şi WEISHENG.** *Wuxue Zazhi*, 11(1), 6-13, 85, 42, 1991.

402. **TURKER, M. şi HUBLE, J.J.** *Membr.Sci.*, 34(3), 1987, pp. 267-281.

403. **UENG, P. P., VOLPP, K .J., TUCKER, J. V., GONG, C. S. şi CHEN, I. F.** *Molecular cloning of the Escherichia coli gene encoding glucose isomerase.* Biotechnol., Lett., 7, 1985, p. 153.

404. *ULIG's Corosion Handbook*, REVIE, W. (editor), John Wiley & Sons Inc., N.Y., 2000.

405. **ULMANEN, L., LUNDSTROM, K., LEHTOVAARA, P., SAROAS, M., RUOHONEN, M. şi PALVA, I.** *Transcription and translation of foreign genes in Bacillus subtilis by the aid of a secretion vector.* J. Bacteriol. 162, 1985, p. 186.

406. **VAGAMOVA, T. I.** *Biochimia.* 54, (1), 1987, pp. 125-135.

407. **VALLINO, Y. J. şi STEPHANOPOULOS, G.** *Carbon flux distributions at the pyruvate branch point in Corynebacterium glutamicum during lysine overproduction.* Biotechnological Progress, Vol.10, No.3, 1994.

408. **VALLINO, Y. J. şi STEPHANOPOULOS, G.** *Metabolic flux distributions in Corynebacterium glutamicum during growth and lysine overproduction.* Biotechnology and Bioengineering, Vol. 41, No. 6, 1993.

409. **VAN den BERG, R. B.** *Proces tehnologic.* 10, 1987, pp. 49-53, Chem. Abstr., 108, 96845b, 1988.

410. **VAN den BERG, R. B. şi SMOLDERS, C. A.** *Filtr. Sep.* 25(2), 1988, pp. 115-121, Chem. Abstr. 108, 223650m, 1988.

411. **VASCONSUELO, A., GIULIETTI, A. M., BOLAND, R.** *Signal transduction events mediating chitosan stimulation of anthraquinone synthesis in Rubia tinctorum.* Plant Science, 166, 2004, pp. 405-413.

412. **VASILESCU, I.** *Enzimele.* Editura Academiei, Bucureşti, 1961.

413. **VASILESCU, I.** *Tehnologia enzimelor.* Editura Tehnică, Bucureşti.

414. **VASU, S. S.** *Enzime Pectolitice din Aspergillus niger.* Teza de doctorat, Universitatea Bucureşti, 1973.

415. **VASU, S., DAN, V., HÎRTOPEAN, A., JURCOANE, ŞT. şi IONIŢĂ, A.** *Activitatea glucozoxidazică şi catalazică a unor tulpini de Aspergillus folosite la obţinerea gluconatului de calciu.* Al IV-lea Simpozion de Microbiologie Industrială, 1984, pp. 345-349,

416. **VASU, S., DAN, V., IONESCU, A., KRAMER, C. şi MUSCĂ, I.** *Lucrările celui de-al III-lea Simpozion de Microbiologie Industrială.* 1982, pp. 74-77.

417. **VENCATA DASU, V., PANADA, T.** *Proc. Biochem.,* (Elsevier Science), 38(6), 2003, pp. 877-880.

418. **VENTOSA, A., NIETO, J. J. şi OREN, A.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, June, 1998, pp. 504-544.

419. **VIDELA, H. A.** *Manual of Biocorrosion.* CRC. Press, Inc., Boca raton, FL., 1986.

420. **VOET, D. şi VOET, J. G.** *Biochemistry.* Willy Ed. 1990.

421. **VORTRUBA, J., EMANUILAVA, E., KAYMAKCHIEV, A. şi PAZLAROVA, J.** *Kinetics of α-amylase production in a continuous culture of Bacillus licheniformis.* Folia Miocrobiol (Prague) 29, 1984, p. 19.

422. **VRIJIC, M., KRONEMEYER, W. SAHM, H. şi EGGELING, L.** *Unbalance of L-lysine flux in Corynebacterium glutamicum and its use for the isolation of excretion defective mutants.* J. Bact., vol.177, 1995.

423. **WALCH, M. şi MITCHELL, R.** *Biologically Induced Corrosion.* Ed. DEXTER, S., C., Proc. Of the International Conference on Biologically Induced Corrosion, NACE, Houston, TX, 1986.

424. **WANG CHUANHUAI, ZHANG, GUSBAO, YU HANG ş.a.** (Nanjing, University) Faming Zhuanli Shenging Gongkai Schuomingshu CN 1, 031, 112.

425. **WANG, N. S.** *Continuous immobilized enzyme reactor*, Dep. of Chemical Engineering, University of Maryland, College Park, MD 20742-2111, ENCH485, 2001.

426. **WANG, N. S.** *Enzyme kinetics of invertase*, Dep. of Chemical Engineering, University of Maryland, College Park, MD 20742-2111, ENCH485, 2001.

427. **WANG, RONMING, ZHANG, PENG SHI XIANFENG, SUN YAO ZHANG, ZHANG MINGGI ş.a.** CN 87, 107, 162 (cl C12 P 7/56), 1987.

428. **WANG, RONMING; CHONG, PENG SHI XIANFENG ş.a.** *Dancheng County Biochemistry Factory.* Faming Zhuanli Shenging Cougkai Shuomingahn (cl C 12 P 7/56, 25 oct 1989) C.A. vol. 113, No 9, 111, 1989, p. 3.

429. **WANG, T. T.** *Biochem. J.*,153, 1976, pp. 691-699.

430. **WEINSTEIN, M. J. şi WAGMAN, G. H.** (eds.). *Antibiotics. Isolation, separation and purification.* Elsevier Publ., Amsterdam, 1978.

431. **WILDI, B. S., KIRKWOOD, T. şi VESTMAN, L.** Bv. S.U.A., 3.634.258, 1972.

432. **WILHELM, S.** *Eur. J. Biochem.*, 207(2), 1992, pp. 781-791.

433. **WILLETTS, N.** *Conjugation.* In: „Methods in Microbiology Plasmid Technology", Academic Press, London, vol.17, 1984, pp. 33-59.

434. **WOLFGANG, G.** *Enzyme in Industry.* VCH, 1990.

435. WONG, S., WANG, F. şi DOI, R. H. *Cloning and nucleotide sequence of sen N, a novel Bacillus natto (B.subtilis) gene that regulates expression of extracellular protease genes.* J.Gen.Microbiol., 1988, 139: pp.3264-3276.

436. WOODRUFF, H. B. *A microbiologist's view of Biotechnology.* In: „Biotechnology and Bioengineering Symp. 13, 1983, pp. 1-4.

437. WUHAN, Z.Y. *Daxue Xuebao Ziron Kzueban.* 3, 1990, pp. 95-101.

438. YAMAMOTO, M., TANAKA, Y. şi HORIKOSHI, K. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36, 1972, p. 1819.

439. YAMANE, K. şi SHINDMIYA, A. *Bacillus subtilis α-amylases: Regulation of production and molecular cloning.* In: „Microbiology", American Society for Microbiology, Washington D.C., 1982, pp. 8-11.

440. YAMAZAKI, T. şi KAZUO, I. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, Bv. nr. 91277280, 1992.

441. YANG BIN. *Gongye Weishengwu*, 22(4), pp. 6-9, 13(1992).

442. YANG, M., FERRARI, E., CHEN, E. şi HENNER, D. J. *Identification of the pleiotropic sacQ gene og Bacillus subtilis.* J.Bacteriol., 166, 1986, pp.113-119.

443. YANG, M., SHIMOTSU, H., FERRARI, E. şi HENNER, D. J. *Characterization and mapping of the Bacillus subtilis prtR gene.* J.Bacteriol., 169, 1987, pp. 434-437.

444. YEOMAN, M. M., YEOMAN, C. L. *Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells.* New Phytologist, 134, 1996, pp. 553–569.

445. YKUNOSHIN, K. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, Bv. nr. 01238510, 1988.

446. YONEDA, Y., GRAHAM, S. şi YOUNG, F. E. *Cloning of a foreign gene coding for α-amylase in Bacillus subtilis.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 1979, p. 1556.

447. YOSHIO, F. Jpn. Kokai Tokyo Koho, Bv. 90195879, 1989.

448. YOYOJI, S. Jpn. Kokai Tokyo Koho, Bv. 91191781, 1991.

449. ZAKRZEWSKI, A. M. *The effect of the type of fermenter on the biosynthesis of proteoytic enzymes by Bacillus subtilis* 40. Abh. Akad. Wiss. DDR Abt. Math. Naturwiss. Tech. (3N, Mikros.Enzymprod.), 1981, pp. 481-486.

450. ZARNEA, GH. *Microbiologie generală.* Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1970, p. 650.

451. ZARNEA, GH., MENCINICOPSCHI, GH. şi BRĂGĂREA, ŞT. *Bioingineria preparatelor enzimatice microbiene.* Editura Tehnică, Bucureşti, 1980, p. 349.

452. ZHANEL, G. G., WALTERS, M., NOREDDIN, A., VERCAIGNE, L. M., *Drugs*, 62, 2002, pp. 1771-1804.

453. ZINK, R. T. şi CHATTERJEE, A. K. *Cloning and expression in Escherichia coli of pectinase genes of Erwinia carotovora subsp. Carotovora.* Appl. Environ. Microbiol., 49, 1985, p. 714.

454. ZOTA, V. *Chimie farmaceutică.* Editura Medicală, Bucureşti, 1985.

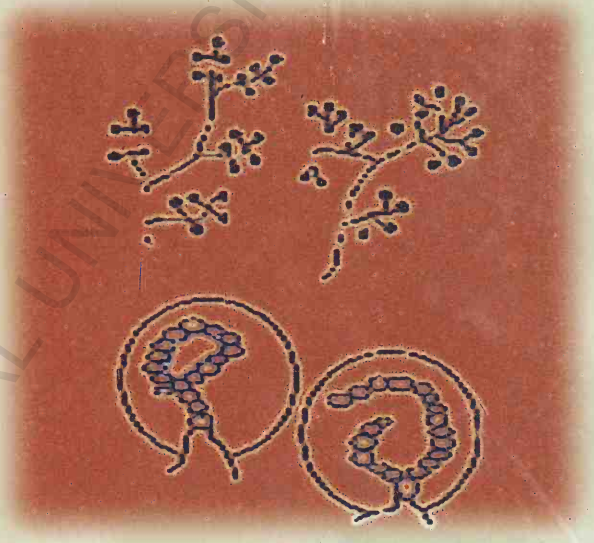
Tiparul executat la ***S.C. LUMINA TIPO s.r.l.*** - str. Luigi Galvani nr. 20 bis, sect. 2, Bucureşti tel./fax 211.32.60; tel. 212.29.27; E-mail: **office@luminatipo.com**; *www.luminatipo.com*

Rezultatele spectaculoase obținute în ultimul timp în domeniul biotehnologiei moleculare au pus bazele unor biotehnologii moderne cu impact economic şi social deosebit în viața cotidiană.

Bioprocesele constituie partea esențială a unor procese specifice industriei chimice, alimentare, farmaceutice şi agroalimentare.

Realizată pe baza ultimelor noutăți în domeniu, lucrarea reprezintă o sinteză a principalelor aspecte legate de elaborarea unui proces de biosinteză a compuşilor: aminoacizi, alcooli, acizi organici, antibiotice cu accent pe obținerea şi purificarea enzimelor.

Lucrarea se adresează studenților, cadrelor universitare, cercetătorilor precum şi specialiştilor dornici de cunoştințe noi în domeniul biotehnologiei şi bioingineriei.



Universitaria

ISBN 973-31-2236-X
ISBN 973-31-2235-1
9 789733 122357

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY